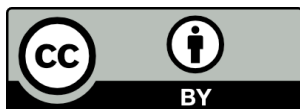




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Acción farmacológica a nivel hepático de los derivados polifenólicos de *Cynara scolymus* L.

Juan Carlos Laguna Egea



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

DEPARTAMENTO DE FARMACOGNOSIA Y FARMACODINAMIA

"ACCION FARMACOLOGICA A NIVEL HEPATICO DE LOS DERIVADOS
POLIFENOLICOS DE Cynara scolymus L."

Memoria que presenta D. Juan
Carlos Laguna Egea, dirigida
por el Dr. D. Tomás Adzet
Porredón y el Dr. D. Jorge
Camarasa García, para la
colación del grado de Doctor en
Farmacia.

Barcelona, Diciembre de 1985.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700083993

A Juan e Isabel, por TODO.



FACULTAD DE FARMACIA

Cátedra de Farmacognosia y Farmacodinamia

Núcleo Universitario de Pedralbes

08028 BARCELONA

Prof. Dr. Tomás Adzet Porredón

D. TOMAS ADZET PORREDON, Catedrático de Farmacognosia y Farmacodinamia, y D. JORGE CAMARASA GARCIA, Profesor Titular Contratado de las mismas disciplinas en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona,

CERTIFICAN : Que la Tesis Doctoral titulada "Acción Farmacológica a nivel hepático de los derivados polifenólicos de Cynara scolymus L.", presentada por D. Juan Carlos Laguna Egea, ha sido realizada bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y posterior defensa ante el Tribunal correspondiente.

Barcelona, 2 de Diciembre de 1985

Fdo. Dr. J. Camarasa

Fdo. Dr. T. Adzet

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. D. Tomás Adzet, Director del Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de Barcelona, y al Dr. D. Jorge Camarasa, por haber aceptado la dirección de esta Tesis. Sin sus consejos y su constante estímulo no habría sido posible su realización.

- Al Dr. D. José Iglesias, Catedrático de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Universidad de Barcelona, por sus indicaciones, fruto de su dilatada experiencia.

- A D. Sergio Hernández, Dña. Pilar Lalueza, Dña. Araceli Gaspar y D. Miquel Puigmacià, por su ayuda en la elaboración de la presente Tesis.

- A todos los integrantes del Departamento que han hecho agradables las horas transcurridas en el mismo.

- Al Dr. D. Rogelio Areal, Jefe del Servicio de Bioquímica del Hospital de Sant LLàtzer de Terrassa, y a la Dra. Dña. Margarita Amadó, por su colaboración desinteresada.

- Al Dr. D. Juan Guinovart, Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria de Barcelona, y al Dr. D. Carlos Ciudad, quienes me asesoraron y pusieron a mi disposición el material necesario para la realización de las experiencias en hepatocitos aislados.

- Este trabajo ha sido posible gracias al soporte económico de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (Proyecto nº 0705/81).

INTRODUCCION

El hígado, por su especial disposición anatómica, recibe directamente la mayoría de sustancias asimiladas por el organismo. Esta particularidad, hace que se encuentre expuesto a la agresión de aquellos compuestos potencialmente tóxicos. Si bien los hepatocitos disponen de sistemas metabólicos capaces de degradar y neutralizar los xenobióticos, el número de éstos es extremadamente amplio. No sólo se encuentran en este capítulo fármacos tales como el paracetamol, la clorpromacina y otros, sino todos aquellos contaminantes que, voluntaria o involuntariamente, se ingieren con cierta asiduidad.

Por todo ello, la incidencia de las afecciones hepáticas de origen tóxico es cada vez más acusada. Su etiología poco definida implica un tratamiento, en la mayoría de los casos, sintomático. El descubrimiento de la silimarina y otros principios de origen natural, ha abierto una vía de esperanza en la solución de esta casuística. Aunque es cierto que existe un grado de escepticismo con respecto a sus posibilidades curativas, es innegable que estos compuestos conjugan una clara acción farmacológica con una mínima toxicidad.

Desde hace unos años, el Departamento de Farmacognosia y Farmacodinamia de la Facultad de Farmacia de Barcelona, investiga la actividad hepatoprotectora de compuestos polifenólicos de origen natural, en la creencia de que el estudio de las propiedades de estas sustancias permitirá el mejor conocimiento de los mecanismos biológicos implicados de la patología hepática, base de la futura instauración de una terapéutica eficaz.

El hecho de que se escogiera como sujeto del estudio la alcachofa (Cynara scolymus L.) radica en que, a pesar de su destacada actividad colerética, no se ha demostrado de forma precisa si esta droga presenta o no propiedades hepatoprotectoras. Del mismo modo, no queda claro el papel que desempeñan los derivados polifenólicos y, específicamente, los cafeilquínicos de la alcachofa.

Se ha trabajado con sustancias polifenólicas puras y con extractos de alcachofa caracterizados por técnicas de HPLC, a fin de poder relacionar las actividades detectadas con un determinado principio o grupo de ellos.

Se ha diseñado un modelo experimental de hepatitis tóxica aguda, producida por CCl_4 , asimilable a la que se desarrolla en el organismo humano. Mediante la analítica plasmática o tisular, se han delimitado una serie de parámetros indicadores de la hepatopatía inducida en la rata. Ello ha permitido la evaluación de las modificaciones producidas por la administración de los productos sujetos a estudio.

La utilización de hepatocitos aislados como reactivo biológico, ha posibilitado la detección de la actividad hepatoprotectora directa de diversos componentes de los extractos, así como la realización de estudios dosis-respuesta.

La exposición de los resultados y las conclusiones derivadas de su interpretación, junto con la descripción de la metodología utilizada y las bases teóricas del estudio, constituyen el objeto de esta Memoria.

INDICE

PARTE TEORICA

A.- LA ALCACHOFA (Cynara scolymus L.)

1.- COMPOSICION QUIMICA	1
2.- ACTIVIDAD FARMACOLOGICA	3
3.- DERIVADOS CAFEILQUINICOS DE <u>Cynara scolymus</u> L.	17

B.- FARMACOLOGIA HEPATICA

1.- MECANISMO DE ACCION DE LOS AGENTES HEPATOTOXICOS	21
2.- MECANISMOS DE DETOXIFICACION	23
3.- REGENERACION HEPATICA	27
4.- TERAPEUTICA DE LAS AFECCIONES HEPATICAS	28

C.- EL TETRACLORURO DE CARBONO

31

PARTE EXPERIMENTAL

1.- MATERIAL VEGETAL	40
2.- REACTIVO BIOLOGICO	42
3.- DETECCION DE LA LESION HEPATICA INDUCIDA POR CCl_4	43

CAPITULO I. ACCION FARMACOLOGICA DE UN EXTRACTO ACUOSO DE Cynara scolymus L.

1.- OBTENCION DEL EXTRACTO ACUOSO	56
-----------------------------------	----

2.-	VIA DE ADMINISTRACION. TOXICIDAD	56
3.-	DETERMINACION DE PARAMETROS SANGUINEOS	60
3.1.-	<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	60
3.2.-	<u>OBTENCION DE LAS MUESTRAS</u>	60
3.3.-	<u>PARAMETROS ESTUDIADOS. METODO DE VALORACION</u>	61
3.4.-	<u>REACTIVOS Y MATERIAL UTILIZADO</u>	64
3.5.-	<u>RESULTADOS</u>	64
4.-	"CLEARANCE" DE LA BROMOSULFOF Taleina	65
4.1.-	<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	65
4.2.-	<u>METODO DE VALORACION</u>	65
4.3.-	<u>RESULTADOS</u>	69
5.-	ESTUDIO HISTOLOGICO	72
5.1.-	<u>OBTENCION DE LAS MUESTRAS</u>	72
5.2.-	<u>PROCESO DE TINCION</u>	72
5.3.-	<u>RESULTADOS</u>	76
6.-	DISCUSION	79

CAPITULO II. ACCION DEL CCl_4 SOBRE EL METABOLISMO PORFIRICO

1.-	INTRODUCCION	87
2.-	HEMOLISIS INDUCIDA POR CCl_4	87
2.1.-	<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	87
2.2.-	<u>VALORACION DE LA HEMOGLOBINA</u>	88
2.3.-	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	89
3.-	ALTERACION DEL METABOLISMO DE LAS PORFIRINAS POR EL CCl_4	91
3.1.-	<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	93
3.2.-	<u>EXTRACCION Y VALORACION DE LAS PORFIRINAS URINARIAS</u>	94
3.3.-	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	98

CAPITULO III. ACCION FARMACOLOGICA DE UN EXTRACTO METANOLICO DE Cynara scolymus L.

1.-	OBTENCION DEL EXTRACTO METANOLICO. ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO	102
2.-	INFLUENCIA DEL EXTRACTO METANOLICO SOBRE EL "CLEARANCE" DE BSP EN ANIMALES INTOXICADOS POR CCl_4	104
2.1.-	<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	104
2.2.-	<u>VALORACION DE LA EXCRECION BILIAR DE BSP</u>	105
2.3.-	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	106
3.-	DETERMINACION DE PARAMETROS SANGUINEOS. CCl_4 AL 20%/24 HORAS POSTINTOXICACION	111
3.1.-	<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	112
3.2.-	<u>PARAMETROS DETERMINADOS</u>	113
3.3.-	<u>RESULTADOS</u>	115
3.4.-	<u>DISCUSION</u>	117
4.-	DETERMINACION DE PARAMETROS SANGUINEOS. CCl_4 AL 10%/24 HORAS POSTINTOXICACION	120
4.1.-	<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	120
4.2.-	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	120
5.-	DETERMINACION DE PARAMETROS SANGUINEOS. CCl_4 AL 10%/48 HORAS POSTINTOXICACION	123
5.1.-	<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	123
5.2.-	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	124

CAPITULO IV. ACCION FARMACOLOGICA DEL ACIDO CAFEICO, CINARINA Y UN EXTRACTO PURIFICADO DE Cynara scolymus L.

1.-	INTRODUCCION	128
1.1.-	<u>GLUCOGENO</u>	128
1.2.-	<u>TRIGLICERIDOS HEPATICOS. ESTEATOSIS INDUCIDA POR CCl_4</u>	129

1.3.-	<u>LIPOPEROXIDACION</u>	130
1.4.-	<u>GLUTATION</u>	132
2.-	METODOS ANALITICOS	137
2.1.-	<u>VALORACION DE GLUCOGENO</u>	138
2.2.-	<u>VALORACION DE LOS TRIGLICERIDOS HEPATICOS</u>	139
2.3.-	<u>VALORACION DE LA PEROXIDACION LIPIDICA</u>	143
2.4.-	<u>VALORACION DEL GLUTATION REDUCIDO</u>	145
2.5.-	<u>VALORACION DE PROTEINAS TOTALES</u>	146
3.-	ESTUDIO DE LA PEROXIDACION LIPIDICA	148
3.1.-	<u>ELECCION DEL TIEMPO IDONEO DE INTOXICACION</u>	148
3.1.1.-	Protocolo Experimental	148
3.1.2.-	Resultados y Discusión	149
3.2.-	<u>EVOLUCION TEMPORAL DEL PROCESO DE LIPOPEROXIDACION</u>	150
3.2.1.-	Protocolo Experimental	150
3.2.2.-	Resultados y Discusión	151
4.-	ESTUDIO DEL CONTENIDO EN GLUCOGENO, TRIGLICERIDOS Y GLUTATION HEPATICO TRAS LA INTOXICACION POR CCl_4	154
4.1.-	<u>ELECCION DEL TIEMPO IDONEO DE INTOXICACION</u>	154
4.1.1.-	Protocolo Experimental	154
4.1.2.-	Resultados y Discusión	155
4.2.-	<u>ESTUDIO DE LA EVOLUCION TEMPORAL</u>	158
4.2.1.-	Protocolo Experimental	158
4.2.2.-	Resultados y Discusión	159
5.-	VALORACION DE LA ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DEL ACIDO CAFEICO, CINARINA Y UN EXTRACTO PURIFICADO DE <u>Cynara scolymus</u> L.	176
5.1.-	PRODUCTOS ENSAYADOS	176
5.1.1.-	Extracto purificado de <u>Cynara scolymus</u> L.	176
5.1.2.-	Acido Cafeico y Cinarina	180
5.2.-	<u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	180
5.3.-	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	181
5.4.-	<u>ACCION DEL ACIDO CAFEICO Y CINARINA SOBRE LA LIPOPEROXIDACION INDUCIDA POR CCl_4</u>	187
5.4.1.-	Protocolo Experimental	187
5.4.2.-	Resultados y Discusión	188

CAPITULO V. ACCION FARMACOLOGICA DE DERIVADOS
POLIFENOLICOS EN HEPATOCITOS AISLADOS

1.-	INTRODUCCION	191
2.-	MATERIAL Y METODOS. OBTENCION DE HEPATOCITOS AISLADOS	192
3.-	PROTOCOLO EXPERIMENTAL. ELECCION DE LAS CONDICIONES DE EXPERIMENTACION	196
3.1.-	<u>INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA EVOLUCION DEL FENOMENO TOXICO. ELECCION DE LA DOSIS DE CCl_4</u>	198
3.2.-	<u>INFLUENCIA DEL ESTADO NUTRICIONAL DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACION</u>	209
4.-	EVALUACION DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE COMPUESTOS POLIFENOLICOS	214
4.1.-	<u>SUSTANCIAS VALORADAS. CONDICIONES DE ENSAYO</u>	214
4.2.-	<u>RESULTADOS</u>	215
4.3.-	<u>DISCUSION</u>	220

CONCLUSIONES

INTOXICACION POR CCl_4	239
TRATAMIENTO FARMACOLOGICO	240

BIBLIOGRAFIA

OBRAS DE CONSULTA GENERAL	242
REFERENCIAS	243

PARTE TEORICA

A. - La alcachofa
(Cynara scolymus L.)

1.- COMPOSICION QUIMICA

La alcachofa (Cynara scolymus L.) es una variedad (sativa Moris) obtenida por la mejora artificial de la alcachofa silvestre (Cynara cardunculus L.), que crece de forma espontánea en la región mediterránea.

La situación taxonómica del género *Cynara*, según TUTIN (1976) y CRONQUIST (1981), es la siguiente:

División Spermatophyta

Subdivisión Magnoliophytina

Clase Magnoliopsida

Subclase Asteridae

Orden Asterales

Familia Asteraceae (Compositae)

Subfamilia Asteroidea

Tribu Carduaceae

El hecho de que la alcachofa se utilice desde la antigüedad como planta medicinal y que, a partir de la época Renacentista, se haya introducido en las mesas europeas, hace que se conozca, de una manera bastante exhaustiva, su composición química. A grandes rasgos, los datos que se poseen en la actualidad indican, como principales constituyentes:

- . Agua 9-10% (hoja desecada)

- . Sales minerales (12-15%), siendo especialmente abun-

dantes los cationes K^+ y Mg^{++} .

- . Azúcares (inulina), mucílagos y pectina.

- . Ácidos glicérico, glicólico, málico, láctico, cítrico y succínico (BOGAERT y col. 1972).

- . Esteroles: β -sitosterol y estigmasterol, derivados de alcoholes triterpénicos (taraxasterol). Existe también un compuesto de tipo saponínico, la cinarogenina.

- . Compuestos volátiles (BUTTERY y col. 1978, FARAG y col. 1980).

- . Lactonas sesquiterpénicas, responsables del sabor amargo de la droga:

- . Cinarólido (DROZDZ 1968).

- . Guayanólidos: Cinaratriol, 3,13-dibenzocinaratriol y 3,11,13-triacetilcinaratriol (BERNHARD y col. 1979). Otros guayanólidos presentes son la groshemina, dihidrocinaropicroina y cinaropicroina (CORBELLA y col. 1972, SCHNEIDER y THIELE 1974).

- . Compuestos fenólicos:

- . Taninos.

- . Antocianos, en las brácteas y hojas (PIFFERI y VACCARI 1978, AUBERT y FOURY 1979). Son derivados del cianidol:

- cianidin-3-cafeilsoforósido.

- cianidin-3-cafeilglucósido.

- cianidin-3-dicafeilsoforósido.

- . Ácidos fenóles y derivados:

Acidos monocateilquinicos

Ac. clorogénico (3-cateilquinico).

Ac. neoclorogénico (5-cateilquinico).

Acidos diccateilquinicos

Ac. 1,3-diccateilquinico

Ac. 1,5-diccateilquinico o cinarina.

Ac. isoclorogénico (mezcla de 3,4/4,5 y 3,5 diccateilquinico).

. Flavonoides, aislados e identificados por primera vez por DRANIK (1966):

Luteolina

Scolimósido (7-rutinosil luteolina).

Cinarósido (7-glucosil luteolina).

Cinaratriósido (7-rutinosil-4'-glucosil luteolina).

2.- ACTIVIDAD FARMACOLOGICA

PIO FONT QUER, en su "Dioscórides Renovado", (1981) señala que:

".....la alcachofa posee asimismo propiedades medicinales, como muchas otras cinarocéfalas o compuestas de cabeza de alcachofa; todas ellas son hipoglucemiantes, esto es, disminuyen la cantidad de azúcar de la orina de los diabéticos. La alcachofa actúa también sobre el hígado, y favorece la secreción de la bilis.....

".....El cultivo y perfeccionamiento del cardo de comer y de la alcachofa

se remontan a gran antigüedad. En diversas representaciones del Antiguo Egipto aparecen con frecuencia unas a modo de piñas, con las hojas o brácteas empi-zarradas, que semejan ser las cabezas de la alcachofera o del cardo....."

Según el mismo autor, ANDRES LAGUNA cita, tomando como fuente a DIOSCORIDES, las siguientes propiedades de la alcachofa:

".....su raíz, negra y gruesa, aplicada en forma de emplastro, corrige la sobaquina y la hidiondez de las otras partes del cuerpo. Lo mismo hace cocida en vino y bebida. Y demás de esto provoca cierta orina hidionda y en grande a-bundancia.....

.....porque el cardo, así crudo como cocido es muy útil no solamente al estómago, empero también al hígado, a la vejiga y a los riñones, y, por el contra-rio, las alcarchofas se convierten luego en humor colérico y melancólico, y per-turban justamente el cuerpo y el ánimo incitando bestialmente a la lujuria....."

Queda por saber exactamente a que plantas atribuía Don ANDRES LAGUNA los nombres de cardo y alcachofera. De todas ma-neras, ya en pleno siglo XVI, AMATUS LUSITANUS (1551) indica que la alcachofa es estimulante de la secreción biliar, an-tirreumática y diurética, mientras que LEMERY (1698), describe de forma categórica la alcachofa como cordial, aperitiva, sudo-rífica, nutriente y restauradora y purificadora de la sangre.

Aunque la afición polular por la planta se mantiene a lo largo del tiempo, el interés de la clase médica es inconstan-te. Durante el siglo XIX no se realiza ninguna aportación

científica sobre la misma; sólo a partir del primer cuarto de este siglo la ciencia experimental centra su atención en la alcachofa, a fin de determinar de una manera precisa sus propiedades farmacológicas. Un breve compendio de todos estos estudios es lo que se intenta exponer a continuación, citando indistintamente ya sea la propia alcachofa como responsable de la acción, o bien alguno de sus constituyentes.

A pesar de la aceptación popular de la actividad hipoglucemiente de la alcachofa, no se encuentra una documentación abundante sobre este tema.

GAHNIAN y ASSENOV (1976), trabajando con un extracto acuoso purificado con metanol de Cynara scolymus L. observan, entre otras acciones, una modificación en la conducta de los animales y un incremento en la amplitud y frecuencia de las contracciones cardíacas, así como una ralentización del tránsito intestinal. Por otra parte, los mismos autores indican que el extracto produce un aumento de la resistencia capilar y una disminución del tiempo de sangría. Este dato parece corroborado por un trabajo de WOJEWSKI y col. (1976), en el que se afirma que la cinarina (ácido 1,5-dicafeoilquinico), a dosis de 30 mg/kg, i.p., durante un período de 5 meses, reduce los niveles de SFMC (soluble fibrin monomer complexes) e incrementa la actividad antiparacoagulante de la pared aórtica en animales con intoxicación crónica por CS₂. Sin embargo, este tipo de actividad es poco específico, ya que se presenta en numerosos compuestos polifenólicos, especialmente flavonoides (GAZAVE 1974).

Dado que, en los estudios anteriores a la década de los setenta, los investigadores no acordaban atribuir a la cinarina la estructura de ác. 1,4-dicafeilquínico o 1,5-dicafeilquínico, se indicará, en su caso, el tipo de isómero descrito por cada autor.

PANIZZI y SCARPATI, en 1965, refutan las aseveraciones de DIOSCORIDES y LEMERY, indicando que la cinarina (1,4-DCQ) no presenta actividad antipermeabilizante ni antiexudativa. Asimismo, la cinarina (1,4-DCQ) posee, conjuntamente con el ácido clorogénico, un poder "inductor" de sabor dulce, sobre todo en forma de sales potásicas (BARTOSHUK y col. 1972) y una acción reconstituyente de los epitelios (BARUZZI y ROVESTI 1972). Estos últimos autores también adscriben al ácido clorogénico propiedades estimulantes del sistema nervioso central, gastrointestinal, respiratorio y circulatorio, en concordancia, salvo para el segundo, con las acciones indicadas por GAHNIAN y ASSENOV para un extracto de alcachofa. De todas formas, es curiosa la investigación del ácido clorogénico como producto utilizable en cosmética después de que, en 1961, FREEDMAN y col. afirmaran que este compuesto es el responsable de la producción de asma, rinitis y dermatitis de origen alérgico en los trabajadores de la industria cafetera.

También se ha de destacar que el ácido clorogénico, así como el cafeico, presentan una actividad antibacteriana (PREZIOSI 1962), que desaparece en presencia de material protéico. Este último dato es corroborado por ADZET y col. (1984), al indicar que el ácido cafeico se une en un elevado porcentaje a

la sero albúmina bovina "in vitro".

La investigación sobre las propiedades terapéuticas de la alcachofa se ha centrado sobre tres acciones principales: actividad diurética, sobre el metabolismo lipídico y sobre el sistema hepatobiliar.

Actividad diurética de *Cynara scolymus* L.

Según AMATUS LUSITANUS, es el propio GALENO el que en primer lugar cita a la alcachofa como estimulante de la producción de orina. Ya en este siglo, LECREC y DECAUX (1939) y, posteriormente, PREZIOSI y LOSCALZO (1957) corroboran dicha acción.

SOKOLOVA y col. (1970) afirman que *Cynara scolymus* L., a la dosis de 0.2 g/Kg, p.o., disminuye los niveles de urea sanguíneos y mejora la supervivencia de conejos afectados de nefritis. El problema consiste en saber de qué están compuestos esos 0.2 g/Kg administrados. RACZ-KOTILLA y col. (1975), son un poco más explícitos, indicando que extractos acuosos, a dosis de 2 g/Kg, presentan un marcado efecto diurético en ratas. Asimismo, encuentran una acción más potente en extractos procedentes de hojas frescas que desecadas, especificando que ambos poseen un contenido similar en derivados polifenólicos. En cualquier caso, el problema se centra en identificar el principio activo responsable de la actividad diurética.

PREZIOSI y LOSCALZO, en 1958, tratan a ratas macho durante 14 días con dosis de 50-125 mg/Kg, i.p., de cinarina (1,4-DCQ). Los animales presentan un notable incremento del

volumen urinario respecto al control, sin que se observen cambios en el sedimento, indicadores de una alteración renal. Igualmente, aumenta la excreción de líquidos en ratas con sobrecarga salina y es capaz de contrarrestar los efectos anti-diuréticos de la vasopresina. Parece claro, pues, que la cinarina es el principio activo. Sin embargo, es importante destacar que el mismo PREZIOSI advierte, en un trabajo posterior (1962), que el poder diurético de la cinarina no se puede comparar con el de los modernos diuréticos de síntesis, pudiendo además estar involucrado en esta actividad diurética el cinarósido. Finalmente, MORTIER en 1972 describe a ciertos ácidos orgánicos, constituyentes de la alcachofa, como los verdaderos principios activos.

Influencia de la alcachofa sobre el metabolismo lipídico

SEZE y ECK y DESBORDES, en 1934, describen una actividad hipocolesteremizante de la alcachofa, precedida por una fase hipercolesterolémica. Trabajos posteriores afirman, no sólo un efecto hipocolesterolémico de extractos de alcachofa administrados por vía oral (LIETTI 1977), sino también un efecto hipolipidemizante (WEIB 1973), con disminución de los niveles séricos de colesterol, fosfolípidos, β -globulinas y albúmina, así como un descenso del colesterol hepático tras administración crónica (SAMOCHOWICZ 1959).

Parece ser de nuevo la cinarina (1,4-DCQ) la responsable de esta acción. Dosis aisladas de 200 mg/Kg, i.v., producen un marcado efecto hipocolesterolémico en el conejo (PREZIOSI y

LOSCALZO 1958), mientras que su administración repetida durante 30 días no induce ninguna modificación, quizás debido a su rápida eliminación biliar (PREZIOSI y col. 1960).

La cinarina (1,4-DCQ) también es efectiva en la hipercolesterolemia inducida por tritón e, histológicamente, se demuestra su acción protectora sobre la pared vascular en animales sometidos a una dieta rica en colesterol (PREZIOSI 1962). Por el contrario, pruebas realizadas "in vitro" no evidencian una potenciación del poder colesterolítico del suero humano, manifestándose únicamente una débil activación de la colesterolasa a concentraciones relativamente altas ($10^{-3}M$).

Todos los datos parecen indicar que la cinarina actúa por inhibición de la síntesis hepática de colesterol (PREZIOSI y LOSCALZO 1958), aparte de la influencia positiva que presente la estimulación de la eliminación biliar del mismo. GAITI y col. (1976) demuestran una inhibición "in vitro" de la incorporación de acetato marcado al colesterol y sus precursores, tras la adición al medio de incubación de dosis bajas de cinarina (1,5-DCQ) y, principalmente, ácido cafeico. En cualquier caso, esta última experiencia no es muy esclarecedora dado que los autores subrayan que, a dosis más elevadas, las mismas sustancias producen un incremento en los niveles de colesterol radiactivo.

Por último, NICHIFORESCU y col. (1976) demuestran que el ácido 1,3-dicafeilquínico disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos, incrementándolos en el tejido hepático, tras administrar dosis de 50 mg/Kg, i.p., durante 12 días. Por tanto, la actividad hipocolesterolémica de la alca-

chofa se debería atribuir a la acción conjunta de sus derivados dicafeilquínicos.

Actividad de *Cynara scolymus* L. sobre el sistema hepato-biliar

CHOMEL, en 1671, prescribe la alcachofa para el tratamiento de los estados de ictericia. Es precisamente al iniciarse este estudio cuando se establece una dicotomía esencial entre dos propiedades que, aunque a veces solapadas, están perfectamente diferenciadas: la actividad colerética y la actividad hepatoprotectora y/o hepatoestimulante de la alcachofa.

Propiedades coleréticas

La administración de extractos de alcachofa a animales de experimentación produce un claro estímulo en la producción de bilis (CHADZAJ y KUZNECOVA 1971, WEIB 1973), confirmando así las prescripciones de la medicina popular. La investigación se ha centrado, por ello, en la identificación de los componentes responsables de esta acción. Debido al elevado contenido en sales de K^+ y Mg^{++} , en un principio se atribuyó a éstas el efecto colerético (BREL 1930), siendo CHABROL y col. (PREZIOSI 1962) los primeros en suponer que la coleresis producida por infusiones de hojas de alcachofa era debida a su contenido en derivados fenólicos.

Dado que se había comprobado el poder colerético de ciertos ácidos cinámicos, como el cafeico y ferúlico (ROHRBACH y

ROBINEAU 1958), se centraron los estudios sobre los derivados cafeilquínicos de la alcachofa, específicamente la cinarina (1,4-DCQ) (PREZIOSI y LOSCALZO 1956). Así, se ha demostrado que este compuesto, por administración de 7.5-100 mg/Kg, i.v., presenta un efecto comparable, a dosis equimoleculares, al del dehidrocolato sódico (PREZIOSI y col. 1959).

Por otra parte, el aumento del flujo biliar comporta un incremento en el residuo seco de la bilis (PREZIOSI y LOSCALZO 1958), atribuible a una activación en la excreción de colatos (LIETTI 1977). Esta acción podría contribuir de forma importante a la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol.

La actividad colerética de la cinarina (1,4-DCQ) depende en gran manera de la vía de administración, siendo máxima por vía intravenosa y mínima por vía endoduodenal (PREZIOSI 1962). Posteriormente, se ha podido constatar que los derivados cafeil quínicos interaccionan con el sistema biliar, presentando una gradación del poder colerético que, en esquema, sería la siguiente:

cinarina > ác. 1,3-dicafeilquínico > ác. clorogénico
> ác. 1-cafeilquínico > ác. cafeico

Aunque estas experiencias indican como principios activos a los derivados cafeilquínicos, no se puede rechazar el trabajo realizado por MORTIER (1972). Según este autor, la administración de un extracto de alcachofa desprovisto de sustancias polifenólicas, pero enriquecido en ácido málico, succínico e hidroximetilacrílico, es capaz de antagonizar la hipoco-

leresis inducida por azida sódica en ratas. Parece pues evidente que esta actividad farmacológica se debería a la acción conjunta de los derivados cafeilquínicos y estos ácidos orgánicos.

Actividad hepatoprotectora y/o hepatoestimulante

El hecho de que una determinada sustancia posea propiedades coleréticas no implica necesariamente el que manifieste un efecto estimulante del funcionalismo hepático, ni que ejerza una función protectora frente a agentes tóxicos. Los estudios realizados sobre Cynara scolymus L. presentan una cierta confusión al respecto, atribuyendo muchas veces indicaciones hepatoprotectoras a la mera coleresis, por lo que son de difícil interpretación.

Es innegable que los derivados cafeilquínicos poseen un tropismo hepático y que, por otra parte, no producen ningún efecto nocivo sobre el funcionalismo hepatocitario, ya que, por ejemplo, no modifican la excreción de bromosulfoftaleína (PREZIOSI y col. 1959). La situación se complica al intentar comprobar un efecto protector frente a la acción de hepatotoxinas. LOSCALZO y col. (PREZIOSI 1962) no observan ningún signo de recuperación en animales intoxicados con tetracloruro de carbono (CCl_4) y tratados con cinarina (1,4-DCQ), mientras que PREZIOSI (1962) demuestra una recuperación significativa valorando el tiempo de excreción de la bromosulfoftaleína, pero sin que se modifiquen los valores anormalmente elevados de

transaminasas plasmáticas. Ambos resultados responderían a una recuperación del funcionalismo hepático sin modificación del grado de necrosis hepatocitaria. El mismo autor advierte una evolución positiva en el tratamiento de la esteatosis de origen dietético (20 mg de cinarina (1,4-DCQ)/Kg, durante 24 días), mientras que la actividad es nula sobre la degeneración grasa inducida por dicloroetano. Unicamente KISO y col. (1983) demuestran un claro efecto protector de la cinarina (1,5-DCQ) en cultivos primarios de hepatocitos intoxicados con galactosamina.

Los estudios realizados a nivel molecular no aportan ningún dato esclarecedor. GORACCI y col. (1976) aprecian una inhibición en la actividad de las fosfolipasas A_1 y A_2 tras la adición de cinarina (1,5-DCQ) y ácido cafeico (10^{-3} M) al medio de incubación. Estos resultados son corroborados por BINAGLIA y col. (1976) que observan, en idénticas condiciones, una inhibición en la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidil etanolamina hepáticas. Este hecho comportaría un incremento en el contenido de lecitina y, por tanto, de ácidos grasos insaturados, indispensables para el mantenimiento de las biomembranas. Sin embargo, efectuando experiencias similares en microsomas procedentes de animales intoxicados con etanol, el efecto es completamente inverso (ROBERTI y col. 1976).

PELT (1981) afirma que los ácidos cítrico, succínico, málico e hidroximetilacrílico poseen propiedades hepatoprotectoras, basándose en dos hechos experimentales (MORTIER y col. 1976):

La administración de una mezcla de estos ácidos disminuye el tiempo de sueño inducido por pentobarbital y aumenta el valor de la DL_{50} del etanol, en ratones. En el primero de los casos se argumenta una activación de las monooxigenasas hepáticas, que degradarían rápidamente el pentobarbital, pero, dado que este fármaco presenta también un carácter ácido, su rápida eliminación podría deberse a un desplazamiento de la unión a proteínas plasmáticas. En el segundo, los mismos autores indican que el efecto podría deberse a una hiperventilación, un incremento de la diuresis o bien una aceleración del metabolismo del etanol.

Farmacocinética y Toxicidad

Haciendo referencia a los aspectos farmacocinéticos de los compuestos fenólicos, es importante destacar que aún presentando las flavonas, flavonoles, flavanonas y las geninas flavónicas en general una escasa o nula absorción intestinal, sin embargo, las catequinas y heterósidos flavónicos se caracterizan por tener una buena absorción a ese nivel (MASQUELIER y col. 1979).

Para los ácidos cinámicos, los principales procesos de metabolismo son la metilación y deshidroxilación, tanto en rata como en conejo (DeEDS y col. 1957). Hay que subrayar la posibilidad de degradación de los compuestos polifenólicos en la propia luz gastrointestinal. En efecto, las secreciones endógenas y la flora microbiana juegan un papel muy importante en este sentido (MOSSER y col. 1974).

La eliminación se realiza esencialmente por vía renal y hepática, por lo que pueden aparecer metabolitos en la bilis.

En cuanto a su toxicidad, hay que señalar que los compuestos polifenólicos son prácticamente inocuos (MASQUELIER y col. 1979). Concretamente, la cinarina (1,4-DCQ) presenta una DL_{50} en ratón, vía i.p., de 2000 mg/Kg y superior a 1000 mg/Kg, vía i.p. o p.o., en rata (MARMO y MIELE 1962). La administración subaguda de dosis de 400 mg/Kg, i.p., durante 15 días, no produce ningún efecto tóxico ni cambios degenerativos en el hígado de rata. Unicamente en el caso de que se prolongue el tratamiento durante 40 días, aparecen lesiones hepáticas y renales, observables a nivel microscópico (PREZIOSI y LOSCALZO 1958).

Aplicaciones terapéuticas

Ya se indicó, al hablar de la actividad diurética de la cinarina (1,4-DCQ), que ésta era de baja intensidad. La bibliografía sólo cita dos indicaciones, en el tratamiento del edema pulmonar asociado a cardiopatías y en la nefroesclerosis toxo-infectiva (PREZIOSI 1962).

La cinarina (ya sea 1,4 o 1,5-DCQ) produce efectos positivos en la hipercolesterolemia asociada a la arterioesclerosis, reduciendo los niveles plasmáticos de lípidos totales y colesterol (SCHONOLZER 1939, MANCINI y col. 1961), normalmente por administración oral, a dosis de 30-1500 mg/día durante 2-3 meses (MANCINI y col. 1960, MARS y BRAMBILLA 1976, WOJCICKI y col. 1976, MONTINI y col. 1976). En contrapartida, CARUZZO y

col. (1969) observan que, en sujetos arterioescleróticos, se produce una disminución inicial del colesterol pero que, a continuación, se restablecen los valores patológicos sin que se modifiquen a lo largo del tratamiento. Asimismo, POMERANZE y CHESSIN (1956) obtienen resultados negativos aunque, en su caso, administran un preparado desprovisto de derivados cafeilquínicos. En las hiperlipoproteinemias de origen familiar, la disminución en los valores de colesterol y triglicéridos plasmáticos es nula (HECKERS y col. 1977) o muy ligera (VORVERG 1980).

A nivel hepatobiliar, tanto la alcachofa como la cinarina (1,4-DCQ) aislada, presentan un claro efecto colerético, ya sea en sujetos sanos (CIMA y BONORA 1959) o con disfunción hepática (BERTOLANI y col. 1957), bien por vía oral o endovenosa. La modificación del funcionalismo hepático es más difícil de apreciar. Se demuestra una mejora en diversas alteraciones como cirrosis, hepatitis tóxica por hiperalimentación (CAIRELLA y col. 1976), etc. PICCINELLI (1959) afirma haber encontrado una recuperación tras el tratamiento con cinarina (1,4-DCQ), pero asociándola con ácido fólico, vitamina B₁₂, nicotinamida, etc. WOJCICKI y WOYKE (1974) encuentran una disminución en los valores séricos de transaminasas, bilirrubina, fosfatasa alcalina, etc., tras administración de 0.5 g de extracto de alcachofa, p.o., durante 25 días. Sin embargo, el tratamiento se asocia con 0.015 g/día de extracto de ruibarbo y 0.01 g/día de hidroclicorato de chelidonina.

El conjunto de datos presenta siempre dos constantes ca-

racterísticas: tratamiento prolongado en el tiempo y ausencia de manifestaciones secundarias o tóxicas.

3.- DERIVADOS CAFEILQUINICOS DE Cynara scolymus L.

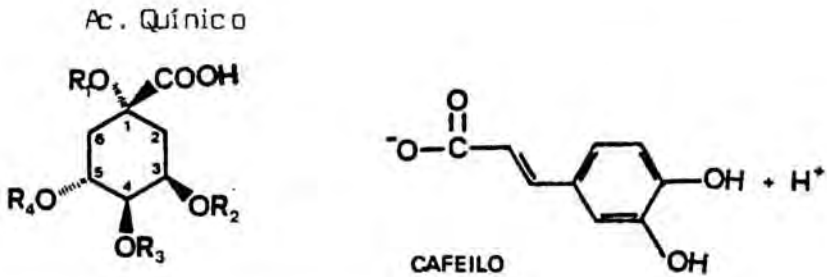
El ácido cafeico es uno de los ácidos cinámicos más extendidos en la naturaleza. Se encuentra en forma libre y en múltiples combinaciones, de las cuales la más frecuente es la esterificación de los hidroxilos del ácido quínico.

Derivados monocafeilquínicos

Según la posición del hidroxilo esterificado existen cuatro isómeros. El más ampliamente distribuido en la naturaleza es el ácido 3-cafeilquínico o clorogénico (Fig. I). Ello se ha de atribuir a que constituye la estructura más estable.

El ácido 5-cafeilquínico o neoclorogénico fue aislado e identificado por primera vez por CORSE (1953). Posteriormente SCARPATI y col. (1964) lo obtuvieron por síntesis química.

El ácido 4-cafeilquínico o criptoclorogénico fue identificado por SONDHEIMER y col. (1961). Este autor lo denominó "banda 510" debido a sus propiedades cromatográficas. Por último, el ácido pseudoclorogénico o 1-cafeilquínico se cita por primera vez en los trabajos de URITANI y MIYANO (1955), siendo SCARPATI y col. (1958) responsables de su síntesis.



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	ACIDO
Cafeilo	H	H	H	pseudoclorogénico
H	Cafeilo	H	H	clorogénico
H	H	Cafeilo	H	criptoclorogénico
H	H	H	Cafeilo	neoclorogénico

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	ACIDO
Cafeilo	Cafeilo	H	H	1,3-dicafeilquínico
Cafeilo	H	H	Cafeilo	cinarina
H	Cafeilo	Cafeilo	H	isoclorogénico
H	Cafeilo	H	Cafeilo	isoclorogénico
H	H	Cafeilo	Cafeilo	isoclorogénico

Figura I

Derivados dicafeilquínicos

La inestabilidad de esta serie de compuestos ha dificultado el proceso de aislamiento e identificación. El primero de estos derivados, el ácido isoclorogénico, fue aislado del café por BARNES y col. (1950), quienes lo consideraron como isómero del ácido clorogénico y, por tanto, con estructura de monocafeilquínico. En 1963, SCARPATI y GUIZO determinaron que era una mezcla de los ácidos 3,4-, 3,5- y 4,5-dicafeilquínicos.

Los tres isómeros restantes (1,3-, 1,4- y 1,5-) están ya estrechamente relacionados con la alcachofa. El ácido 1,3-dicafeilquínico fue hallado por primera vez en un extracto alcohólico de hojas de alcachofa (PANIZZI y SCARPATI 1965). En este mismo tipo de extracto se encontró también el compuesto que se consideró principio activo, el isómero 1,4-dicafeilquínico, denominado cinarina. Fue el propio PANIZZI quien identificó al ácido 1,5-dicafeilquínico como la verdadera cinarina (Fig. 1). DRANIK, en 1965, corrobora este dato al obtener, a partir de un extracto acuoso, una sal sódico-potásica de cinarina con un comportamiento idéntico al del ácido 1,5-dicafeilquínico.

En 1957, SCARPATI y col. ponen de manifiesto la presencia en la alcachofa de ácido cafeico libre (rebatida por numerosos autores), ácido clorogénico y un isómero de éste que se relaciona con el ácido isoclorogénico aislado del café. No es hasta el año 1963 cuando SCARPATI y ESPOSITO asignan definiti-

vamente la estructura de este isómero a la del ácido neoclorogénico. Posteriormente, se identifica también la presencia de ácidos pseudoclorogénico y criptoclorogénico en los extractos de alcachofa (DRANIK y CHERNOBAI 1967).

El problema radica en determinar si estos compuestos son constituyentes primarios de la alcachofa o se producen como artefactos de extracción, consecuencia de fenómenos de isomerizaación; sobre todo, la transesterificación de los residuos en los diferentes hidroxilos del ácido quínico. Asimismo, es posible la aparición de isomería cis-trans por acción de la luz durante el proceso de extracción.

Todo ello condujo a la sospecha de que la cinarina, como ácido 1,5-dicafeilquínico, era un artefacto de extracción, generado por la transesterificación del ácido 1,3-dicafeilquínico existente en el vegetal. Actualmente, la mayor sensibilidad de los métodos analíticos utilizados permite afirmar que, tanto el ácido cafeico libre como la cinarina, son constituyentes primarios de Cynara scolymus L. (IGLESIAS y col. 1985).

B. - Farmacología Hepática

1.- MECANISMO DE ACCION DE LOS AGENTES HEPATOTOXICOS

Cualquiera que sea el agente causal de una lesión hepática, la secuencia fenomenológica que se produce es siempre la misma, pudiéndose concretar en las siguientes etapas (Fig. II) (PERRISSOUD y TESTA 1982):

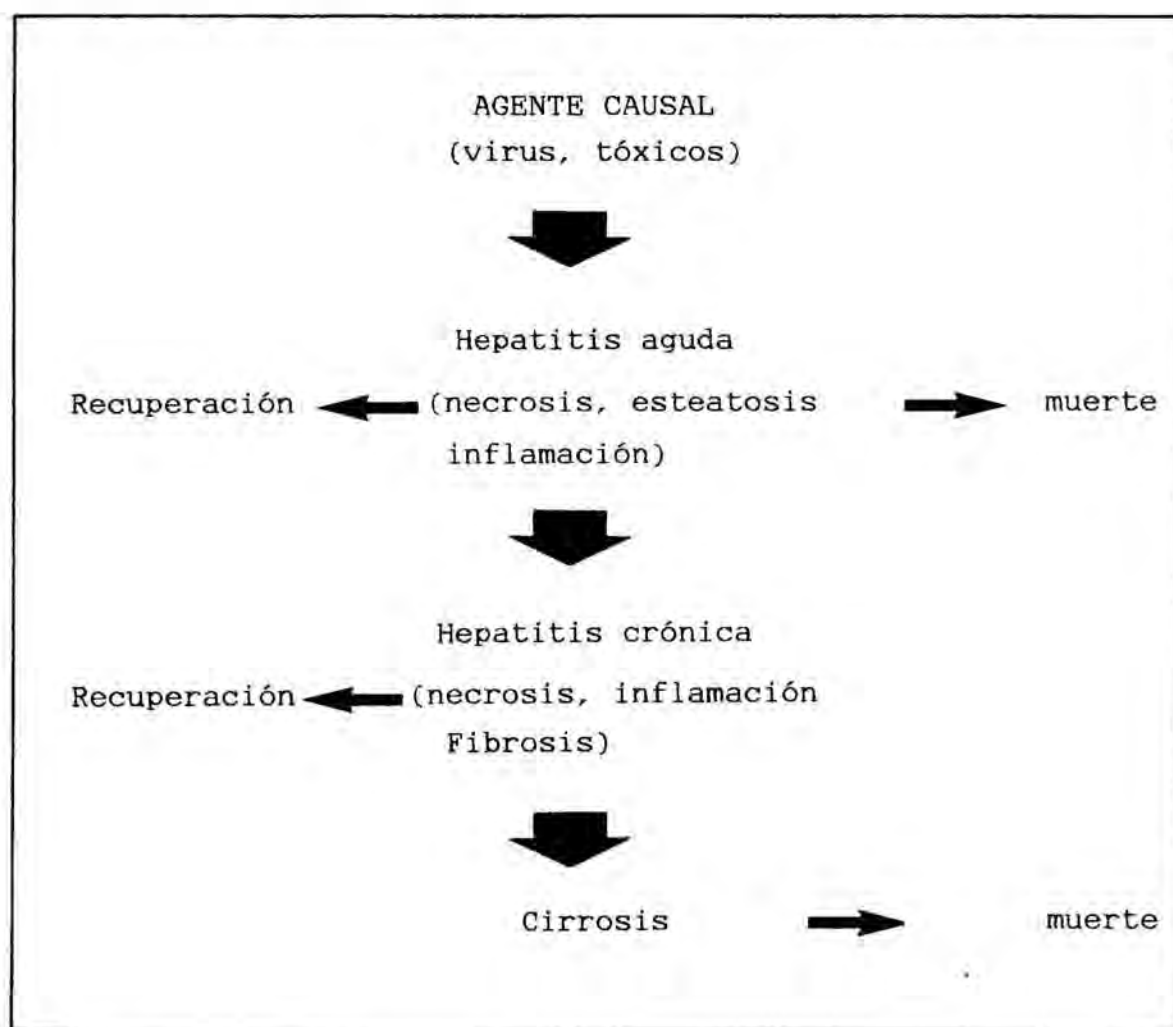


Figura II

En la mayoría de los casos, los agentes hepatotóxicos

afectan primariamente a los hepatocitos y, con mucha menor frecuencia, las células de los conductos biliares o del sistema vascular. El mecanismo desencadenante de la lesión puede encuadrarse en cuatro modalidades diferentes:

Metabolización del agente exógeno, que conduce a la producción de un compuesto tóxico. Es el caso de numerosos hidrocarburos halogenados, como el tetracloruro de carbono (CCl_4), bromobenceno, etc. (STRUBELT y col. 1978), alcaloides pirrólicos (GARRET 1982) y hepatocarcinógenos (PERRY 1982). Posteriormente pueden producirse uniones a macromoléculas (ADN, enzimas, etc.) y fenómenos de lipoperoxidación.

Inhibición o estimulación de sistemas enzimáticos, como es el caso de aquellas sustancias que bloquean las monooxigenasas hepáticas - SKF-525A - (JAMES y HARBISON 1982), o bien inducen su síntesis - metilcolantreno - (POLONOVSKI y ETIENNE 1969).

Alteración de una vía metabólica esencial para el funcionamiento hepático, como puede ser la disminución de ATP inducida por etionina o la deplección en uracilnucleótidos producida tras la administración de galactosamina (ROZE y col. 1980).

Interacción de la toxina con un receptor hepatocitario específico, como ocurre con la aflatoxina (GREEN y col. 1982), faloidina (FRIMMER 1971) y otras micotoxinas. Asimismo, por alteración directa de componentes estructurales esenciales

(RAUEN y col. 1973)

Al igual que otras clasificaciones, ésta implica una visión simplificada de una realidad mucho más compleja. Así, el CCl_4 también puede considerarse que altera las vías metabólicas hepatocitarias, dado que produce una disminución en los niveles de NADPH celulares. Por otra parte, el SKF-525A puede actuar como agente terapéutico, bloqueando la producción de metabolitos tóxicos (FERREYRA y col. 1977).

En todos los casos, el producto final es una alteración de la homeostasis del Ca^{++} , con destrucción de estructuras celulares y rutas metabólicas. Todo ello conduce a la muerte del hepatocito, siendo la necrosis el punto final común de la actuación de todos los hepatotóxicos (VRIES 1983).

El hígado presenta, por su parte, dos sistemas de defensa ante las agresiones externas. Son los mecanismos de detoxificación y la regeneración hepática.

2.- MECANISMOS DE DETOXIFICACION

El mejor sistema que tiene el hepatocito frente a un agente tóxico es facilitar su desaparición del medio. Para ello, lo somete a un complejo metabolismo, encaminado a la formación de compuestos hidrófilos, fácilmente eliminables por la orina, e inactivos. Si el metabolito formado no posee aún las características necesarias para su excreción, el hepatocito puede conjugarlo con diferentes sustratos, a fin de formar derivados solubles y eliminables por vía renal o biliar.

El proceso metabólico se realiza en el sistema multienzimático microsomal, también denominado "sistema oxidativo de función mixta" (mixed-function oxidase system). La información existente sobre este complejo enzimático es tan extensa (ALBRECHT 1972, LU y LUVIN 1974, VAN der HOEVEN y COON 1974, AXELROD 1982, etc.) que hace imposible una descripción detallada del mismo. Se intentará únicamente aportar los datos necesarios para la comprensión del importante papel fisiológico que desempeña.

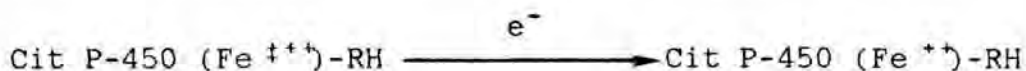
Localizado en la zona lisa del retículo endoplasmático, esta formado por tres constituyentes principales: la citocromo P-450 reductasa, flavoproteína dependiente de NADPH, el propio citocromo P-450 y la matriz fosfolipídica que los integra y agrupa. En realidad, el nombre de citocromo P-450 es de carácter genérico. La adaptación evolutiva ha producido, para cada flavoproteína, un gran número de citocromos diferentes (a modo de "isoenzimas"), lo que explica el amplio espectro de xenobióticos que pueden interaccionar con el sistema. Asimismo, cada especie animal presenta su propia dotación de citocromos, lo que determina las peculiaridades metabólicas de cada una de ellas (LU y WEST 1980). Quizá, una de las características de este sistema es la de ser "específico" para cualquier tipo de xenobiótico. Por otra parte, factores tales como la edad, estado nutricional y fisiológico, dieta, presencia de agentes inductores, etc., pueden alterar, en un mismo individuo, las propiedades del complejo metabólico.

El citocromo P-450 es una hemoproteína cuyo grupo prostético, centro catalítico del enzima, es una protoporfirina IX-Fe⁺⁺⁺. El ciclo enzimático se inicia por la formación del complejo enzima oxidado-xenobiótico (RH), o complejo B.



La unión del sustrato, realizada en la parte proteica del enzima, induce una alteración conformacional del mismo que revierte sobre el grupo prostético. De esta forma, el Fe⁺⁺⁺ queda en un estado pentacoordinado, incrementándose su potencial redox. De hecho, este complejo es el sistema oxidante más potente encontrado en un medio biológico.

El complejo B es capaz de aceptar un electrón proveniente del NADPH, mediante la intervención de la citocromo P-450 NADPH reductasa, apareciendo el complejo C o citocromo reducido.



La tercera etapa del ciclo conduce a la fijación reversible del oxígeno sobre el Fe⁺⁺, formándose el oxicitocromo P-450. La ruptura de este complejo libera el sustrato hidroxilado, agua y el citocromo regenerado, en su forma Fe⁺⁺⁺.

Se supone que este sistema estaba estructurado, inicialmente, para el metabolismo de sustancias endógenas. Por razones evolutivas, los cordados terrestres tuvieron que adaptar sus dotaciones enzimáticas de forma que fueran capaces de in-

teraccionar con sustancias ajenas al organismo, creándose así un arma de doble filo. La reducción monoelectrónica del oxicitocromo P-450 conduce a un intermediario altamente reactivo, de naturaleza electrófila, capaz de interaccionar con los nucleófilos existentes en el medio celular. De esta manera, el mecanismo ideado para la inactivación de tóxicos potenciales puede crearlos en su propio seno, induciendo la producción de hepatotoxinas (MANSUY 1979).

Una vez formado el metabolito hidrófilo, éste se prepara para su eliminación por tres procesos:

Glucuroconjugación. Se produce por la unión del xenobiótico al ácido glucurónico, catalizada por un grupo de enzimas denominados glucoroniltransferasas, actuando como dador de glucurónico su derivado uridín difosfato. En todos los casos, la función ácida queda libre, de forma que facilita la solubilización y eliminación del compuesto (SCHAPIRA 1981).

Sulfoconjugación. En esencia, consiste en la unión del metabolito al ácido 3-fosfo-adenosín-5'-fosfosulfúrico o PAPS, por acción de sulfotransferasas. Se ha de señalar que, en ciertos casos, la sulfoconjugación también puede comportar un incremento en la toxicidad de los xenobióticos (THURMAN y KAUFFMAN 1980).

Interacción con el glutathione.

3.- REGENERACION HEPATICA

El hígado posee la capacidad de recuperar su morfología primitiva cuando por hepatectomía o muerte celular parciales se pierde parte del tejido. La recuperación en peso y volumen se produce a expensas de la combinación de un proceso hipertrófico, acompañado de una activa síntesis proteica y de ARN, y de un proceso hiperplásico, producido por divisiones celulares previa síntesis de ADN.

La proliferación de los hepatocitos está controlada por hormonas. Así, tienen una acción estimulante la hormona del crecimiento, la paratiroidea y las hormonas pancreáticas, mientras que los esteroides corticosuprarrenales presentan el efecto contrario. Otras moléculas orgánicas, como las prostaglandinas, juegan un importante papel en el desencadenamiento de los mecanismos de regeneración. En cualquier caso, no ha podido demostrarse que ninguna de ellas sea el estímulo que inicie la proliferación celular, puesto que en su ausencia o disminución el hígado es también capaz de autorregenerarse.

Parece más probable que la regeneración esté sometida a un control multifactorial, integrado por la "demanda metabólica" ocasionada por la brusca desaparición de parte del parénquima funcional (HANG y col. 1973).

Sin embargo, en los últimos años se ha puesto en evidencia la existencia de factores humorales, de naturaleza no hormonal, cuya misión específica sería regular el proceso regenerativo. Se encontrarían así factores estimulantes, de los cuales

únicamente se conoce su naturaleza proteica, e inhibidores histicos o chalonas, péptidos de bajo peso molecular, aislados del hígado de conejo y que, sistetizados por los propios hepatocitos, actúan reprimiendo la síntesis de ADN y la división celular. Los niveles tisulares de chalonas hepáticas estarían en función de la masa del órgano. Disminuída ésta por hepatectomía o necrosis, se desbloquearía el ciclo celular y empezaría la división hasta que la nueva masa de hepatocitos produjera concentraciones tisulares de chalonas normales (GOMEZ-LECHON y CASTELL 1982). En cualquier caso, el hígado regenerado difiere, tanto morfológica como funcionalmente, del primitivo (KARON 1974). Esta diferencia no es sólo aplicable a su dotación enzimática (KLOCKARS y WEGELINS 1969), sino a la resistencia presentada frente al ataque de diversas hepatotoxinas (REUTTER y col. 1975, ROBERTS y col. 1983).

4.- TERAPEUTICA DE LAS AFECCIONES HEPATICAS

Los medios que se disponen actualmente en Farmacología para coadyuvar a la recuperación del funcionalismo hepático son los siguientes (EGER 1964):

Agentes que actúan específicamente sobre el factor causal. En este grupo se incluirían los fármacos antiviricos e inmunomoduladores (YOSHIKAWA y col. 1982).

Agentes antinecróticos. Comprenden dos tipos de fárma-

cos:

- . Compuestos que proporcionan grupos sulfhidrilo, de forma que mantienen la reserva hepática de glutathion reducido y, por ende, la actividad de todos los enzimas que presentan en su centro activo grupos tiol. Sería el caso de la cisteína (MIRANDA y col. 1982), 2-mercaptopropionilglicina (SHIMOYAMA y col. 1965) y otros mercaptanos (RAUEN y col. 1973).

- . Compuestos que, por su acción específica, impiden la actuación del tóxico. En este grupo se incluirían sustancias de tipo polifenólico, como la silimarina (RAUEN y SCHRIE-WER 1971) y el cianidanol (PIAZZA y col. 1983).

Agentes anti-esteatósicos. También denominados sustancias lipotrópicas, previenen la acumulación de grasa en el hígado y facilitan su eliminación. Destacan, principalmente, la colina y la metionina.

Corticoides antiinflamatorios. Por ejemplo, la prednisona presenta una acción preventiva y curativa frente a la intoxicación por galactosamina. Parece que actúan por estabilización de los lisosomas hepáticos (GRASES y col. 1972).

Agentes que coadyuvan a la regeneración hepática. Se incluyen aquí todos los fármacos que proporcionan al hepatocito constituyentes celulares que favorecen su funcionalismo. Tal es el caso de los extractos hepáticos, vitaminas (CHEN y col. 1982), fosfolípidos (RAUEN y col. 1973), aminoácidos (COSSALI y ROGNONI 1962), etc.

Agentes antifibróticos. De indicación en el tratamiento de la cirrosis, reducen la extensión de las formaciones nodulares. Los más utilizados son la D-penicilamina y la colchicina (ROJKIND y col. 1973).

C. - El Tetracloruro de Carbono

La importancia del CCl_4 en la Farmacología Experimental radica en el hecho de que su administración al animal de laboratorio produce lesiones similares a las que aparecen en clínica humana. Así, el tratamiento con una dosis única, vía oral, se manifiesta en un cuadro de necrosis centrolobulillar y esteatosis, semejante al producido en la hepatitis aguda humana (GOPINATH y col. 1980), mientras que la administración crónica, también por vía oral, acarrea la aparición de un cuadro típicamente cirrótico (ROJKIND y DIAZ de LEON 1970), aunque algunos autores cuestionan últimamente esta afirmación (PEREZ 1983).

El problema radica en delimitar cuál es el mecanismo primario, desencadenante de la secuencia de alteraciones que conducen a la producción de esteatosis y a la muerte del hepatocito. De entre las numerosas hipótesis emitidas se destacarán, por orden cronológico, las más importantes (RECKNAGEL 1967, 1983).

Hipótesis de los fosfolípidos

La manifestación inmediata de la intoxicación por CCl_4 es la aparición de un acúmulo de grasa, principalmente en forma de triglicéridos, en el hepatocito. Basándose en la suposición de que los fosfolípidos eran la forma mayoritaria de transporte plasmático de los ácidos grasos, se supuso que la esteatosis y, posteriormente, la necrosis, se producían por un bloqueo del paso de triglicéridos a fosfolípidos, de forma que su secreción al plasma se veía interrumpida y quedaban acumulados en el hígado. Dos hechos experimentales rechazaron esta hipótesis:

El descubrimiento de que no son los fosfolípidos, sino los mismos triglicéridos (en forma de lipoproteínas) los responsables mayoritarios del transporte plasmático de ácidos grasos.

La demostración de que ciertas sustancias, como el ácido orótico, producen esteatosis sin conducir a un fenómeno necrótico.

Hipótesis mitocondrial

El CCl_4 produce una alteración en la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que acarrea una liberación al citosol de componentes estructurales, tipo nucleótidos de piridina, citocromos, etc., conduciendo a un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y del ciclo de Krebs. Esto podría explicar la aparición del hígado graso y la muerte celular.

La demostración de que la acumulación grasa era independiente de la disfunción mitocondrial, apareciendo horas antes que cualquier manifestación de lesión en las mismas, hizo desechar también esta hipótesis.

Hipótesis indirecta. Acción de las catecolaminas

El CCl_4 disminuye el flujo hepático arterial y la captación de oxígeno (KISENZI y col. 1981). Este hecho, junto con la comprobación de que el CCl_4 carece de poder esteatógeno en

ratas adrenalectomizadas, reserpinizadas y, sobre todo, sometidas a una sección de la médula espinal, indujo a pensar que los efectos tóxicos eran debidos, no a una acción directa del tóxico sobre el hepatocito, sino a una descarga masiva y persistente del sistema nervioso simpático, ocasionada por la acción del CCl_4 a nivel del sistema nervioso central. Esta descarga de neurotransmisores tendría como consecuencias:

Disminución del flujo sanguíneo hepático, asociada a hipoxia centrilobulillar, lo que conduciría a la aparición de necrosis.

Incremento de la movilización de ácidos grasos a partir de las reservas periféricas, lo que conllevaría a una sobrecarga de la capacidad metabólica del hígado.

Posteriormente, se comprobó que la protección observada en las ratas sometidas a un proceso de anulación del sistema nervioso simpático, era debida a la producción de una hipotermia, que deprimía de forma manifiesta el funcionalismo hepático, haciéndolo menos susceptible al ataque del tóxico. Por otra parte, se ha demostrado que la capacidad metabólica del hígado supera con creces el posible "stress" graso inducido por una descarga adrenérgica.

Depresión de la síntesis proteica hepatocitaria

El CCl_4 produce una desagregación de las partículas ribosomales, separándolas de las membranas del ergastoplasma, y la consiguiente inhibición de la síntesis proteica (SIDRANSKY y

VERNEY 1982), siendo manifiesta una hora después de la intoxicación.

Parece claro que la inhibición de la síntesis protéica sea el fenómeno primario desencadenante de la necrosis celular, dado que se eliminan de forma drástica todos los complejos enzimáticos necesarios para el funcionalismo del hepatocito. Estudios recientes han demostrado que otros tóxicos hepáticos (etionina) producen inhibición de la síntesis protéica en los primeros momentos de la intoxicación pero, a pesar de esta lesión inicial, no inducen la muerte celular en un período de tiempo superior a las 24 horas, por lo que no se puede considerar el bloqueo de la síntesis proteica como el proceso primario desencadenante de la muerte del hepatocito.

La acumulación grasa se intentó explicar como una deficiencia en la síntesis de la apoproteína necesaria para la formación de las lipoproteínas transportadoras de los triglicéridos en el plasma. Hace descartar esta hipótesis el hecho de que comience a acumularse grasa a la media hora de la intoxicación, dado que si fuera un mero problema de síntesis, el flujo de apoproteína, captada por el hígado del plasma, bastaría para mantener la excreción de triglicéridos en valores normales durante varias horas.

Hipótesis actual. Activación metabólica

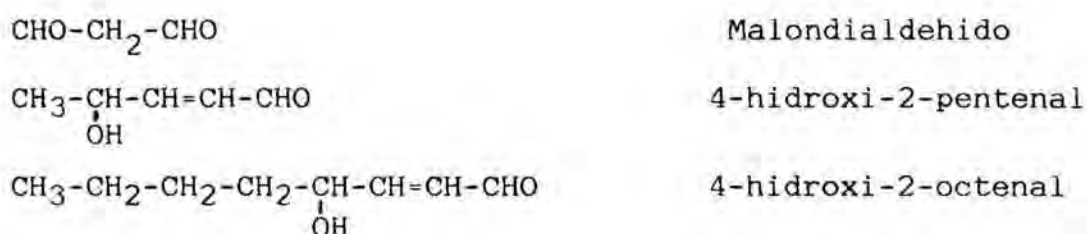
Parece existir un común acuerdo en designar, como fenómeno inicial que conduce a la acción tóxica del CCl_4 , la ruptura

de un enlace C-Cl. En este proceso, denominado reducción enzimática monoelectrónica, interviene también un citocromo P-450 específico, actuando como catalizador la citocromo P-450 reductasa NADPH dependiente (MASON y CHIGNELL 1982). Su intervención conduce a la formación del radical triclorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) y, en pequeña proporción, el radical triclorometilperoxi ($\cdot\text{OCCl}_3$). Corrobora esta hipótesis el hecho de que numerosas sustancias, tales como el etanol (STRUBELT 1980) y el isopropanol (PLAA y col. 1982), que activan el metabolismo hepático, potencian la toxicidad del CCl_4 .

El problema vuelve a plantearse al intentar relacionar la formación de este radical con la aparición de los fenómenos anteriormente citados (alteración mitocondrial, inhibición de la síntesis protéica, etc.). Tres mecanismos parecen intervenir en mayor o menor grado:

Unión covalente a macromoléculas. El radical $\cdot\text{CCl}_3$ es capaz de unirse covalentemente a lípidos y proteínas del retículo endoplásmico, mecanismo que puede explicar la autodestrucción del citocromo P-450 en el proceso de metabolización del tóxico (FANDER y col. 1982). Ahora bien, el radical $\cdot\text{CCl}_3$ es tan reactivo que su vida media oscila alrededor de 10^{-4} segundos. Esto hace difícil de definir el mecanismo de transmisión de la lesión hacia zonas alejadas de los citocromos, como pueden ser los polirribosomas, mitocondrias, etc., simplemente por un proceso de unión covalente a macromoléculas constituyentes de estas estructuras, ya que el radical $\cdot\text{CCl}_3$ no tiene tiempo material de llegar a ellas.

Lipoperoxidación. El radical $\cdot\text{CCl}_3$ induce, asimismo, un proceso de peroxidación de los ácidos grasos insaturados constituyentes de la membrana del ergastoplasma (RAUEN y col. 1973), afectando, mayoritariamente, a la fosfatidilserina (SMUCKLER y JAMES 1984). La degradación de los peróxidos formados conduce a la formación de malondialdehído y estructuras de tipo 4-hidroxialcano:



Estos productos de degradación actúan inhibiendo, per se, la actividad de los citocromos, glucosa-6-fosfatasa, etc. (LEVIN y col. 1973).

La principal objeción a la teoría de la lipoperoxidación radica en el hecho de que numerosos protocolos experimentales se han realizado en medios ricos en Fe^{++} . Cuando estas determinaciones se han llevado a cabo en presencia de EDTA o a una baja concentración de Fe^{++} (similar al medio intracelular), la peroxidación ha sido mínima.

Homeostasis del calcio. Tras la administración de CCl_4 se produce una disminución manifiesta en la capacidad de secuestrar el ión Ca^{++} por parte de los microsomas hepáticos (LOWREY y col. 1981). Durante los 10 primeros minutos después de una intoxicación oral, se reducen los valores a un 10-15% de

los encontrados en los animales control. Paralelamente, aparecen las primeras manifestaciones de unión covalente del CCl_4 a componentes microsomales y se inicia la peroxidación. LOWREY y col. (1981) y WALLER y col. (1983), han podido demostrar que am los procesos son responsables directos de la inactivación de la bomba de calcio microsomal.

Parece pues que la clave del mecanismo tóxico radica en esta alteración de la homeostasis del calcio. La captación de Ca^{++} por parte de los microsomas, conjuntamente con su captación mitocondrial y eliminación a través de la membrana hepatocitaria, regula y mantiene la concentración de Ca^{++} citoplasmática alrededor de $0.2 \mu\text{M}$. La alteración producida por el CCl_4 puede inducir un incremento en la concentración de Ca^{++} citosólico, que altere el funcionalismo global del hepatocito. Este hecho, coadyuvado por tres factores:

- . Unión covalente a macromoléculas.

- . Lipoperoxidación.

- . Degradación de fosfoglicéridos de membrana, por activación de la fosfolipasa C- Ca^{++} dependiente (SCHWERTZ y LAMB 1982) y A_2 (STACEY y KLAASEN 1982).

hace prácticamente imposible la viabilidad celular, conduciendo inexorablemente a la muerte del hepatocito.

En conjunto, se podría resumir todo lo dicho hasta ahora en el esquema representado en la figura III. Un agente hepatoprotector puede interaccionar, en principio, en cualquiera de los niveles de ataque del CCl_4 . Sólo destacar, en este caso,

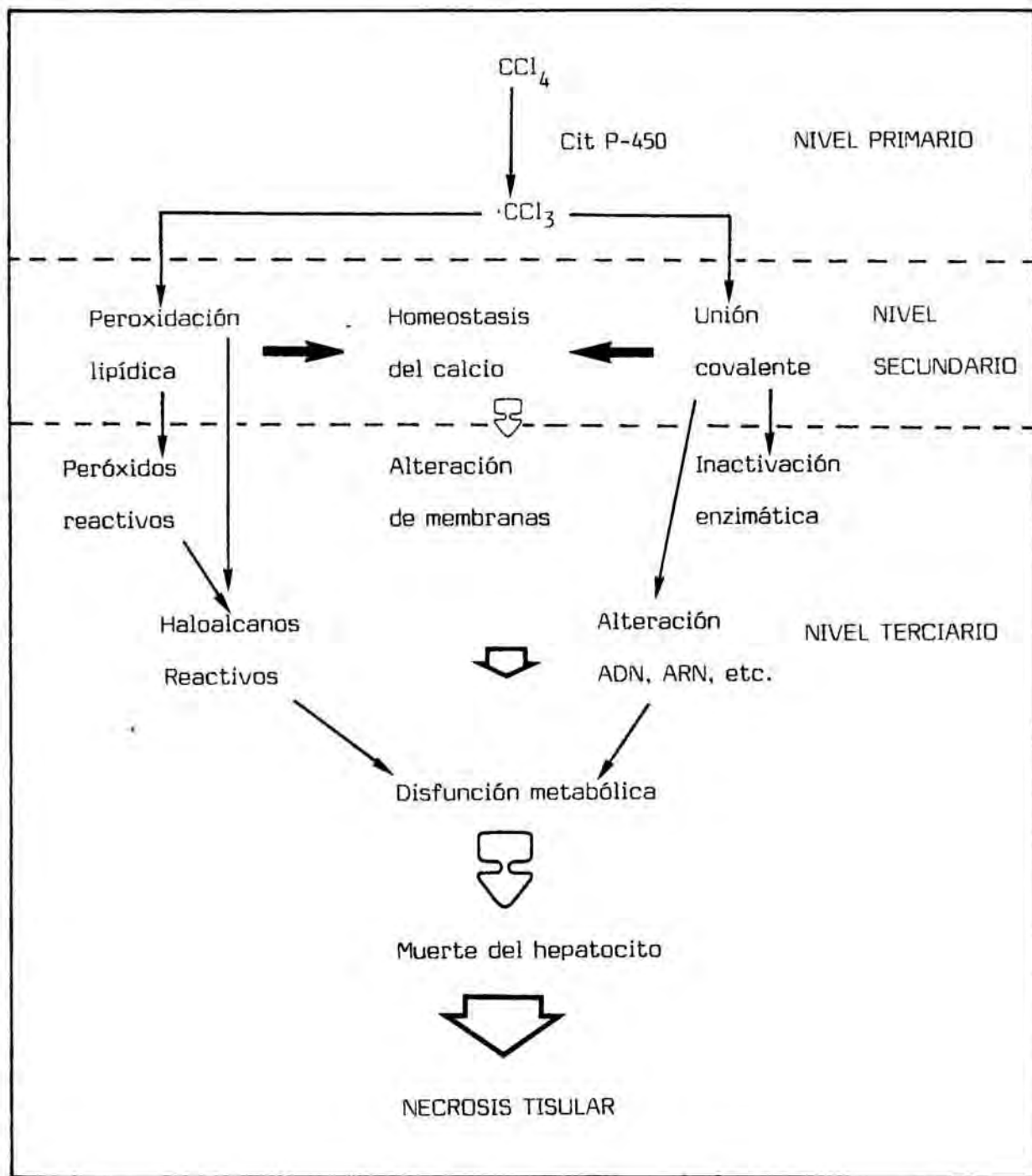


Figura III

la paradoja de que, aquel potencial hepatoprotector que interaccionara a nivel primario sería, en realidad, otro tipo de hepatotoxina. Esto es así dado que el único mecanismo posible de inactivación sería impedir la ruptura catalítica del CCl_4 , lo que comportaría una alteración, si no una destrucción, del sistema monooxigenasa microsomal, esencial, por otra parte, para el completo desarrollo de la actividad vital del hepatocito.

PARTE EXPERIMENTAL

1.- MATERIAL VEGETAL

Procedencia

Como fuente de los extractos de Cynara scolymus L., cuya actividad farmacológica se ha valorado a lo largo de este estudio, se han utilizado hojas basales de alcachofa procedentes de la variedad "Tudela" cultivada en nuestro país (Delta del Ebro, Tarragona).

Aunque el contenido en derivados ortodifenólicos es mayoritario en el capítulo floral y las hojas apicales (LATTANZIO y MORONE 1979), se ha escogido como materia prima las hojas basales por una razón de aplicación práctica. Dado que, en la actualidad, los cultivos de alcachofa se dedican casi exclusivamente a la alimentación humana, las hojas basales son consideradas como un mero producto de desecho. La posible utilización de este material como materia prima en la industria farmacéutica elevaría enormemente el rendimiento de estos cultivos.

La recolección se ha efectuado en el segundo año vegetativo, durante el verano. Según NICHIFORESCU (1966), la conjunción del bajo contenido hídrico en las hojas durante el estiaje y el hecho de que en ellas se concentren los derivados fenólicos antes de la formación del capítulo floral, favorece enormemente el rendimiento del material recolectado.

Conservación del material vegetal

Una vez recolectada la planta fresca, se desencadenan una serie de reacciones enzimáticas (hidrólisis, oxidación, polimerización, etc.) que pueden alterar su composición química. Estas reacciones se desarrollan en un medio acuoso, por lo que se ha escogido como método de conservación la desecación del material vegetal, inhibiendo así los procesos enzimáticos de degradación, por eliminación del ambiente hídrico.

Para obtener una desecación óptima, se han tenido en cuenta las indicaciones propuestas por PARIS y HERISET (1969):

- # Realización en el mismo lugar de recolección, a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. En nuestro caso, la desecación se ha efectuado en los locales del Departamento de Farmacognosia.

- # Depositar el material vegetal en capas de grosor mínimo, para evitar posibles fermentaciones.

- # Eliminar el nervio medio de la hoja, con lo que se acelera el proceso de desecación. Esta práctica no influye en el rendimiento extractivo ya que, proporcionalmente, el contenido en ortodifenoles del nervio medio es despreciable (NICHIFORESCU y COUCOU 1966).

Condiciones de extracción

Debido a la inestabilidad de los derivados cafeilquínicos, las condiciones de extracción influyen enormemente en la

composición de los extractos obtenidos. MICHAUD (1967) establece dos tipos de extracción extremos:

Extracto alcohólico. Aunque poco agresivo, inactiva los sistemas enzimáticos. Se realiza una maceración durante 24 horas en etanol, a partir de planta fresca; se lava con éter y se concentra a menos de 40°C. El análisis proporciona un elevado porcentaje en ác. clorogénico y 1,3-dicafeilquínico, así como ác. neoclorogénico y heterósidos flavónicos en menor proporción.

Extracto acuoso. Consiste en una extracción a ebullición de las hojas, concentrando la solución resultante a 100°C. Mucho más agresivo, en su transcurso se producen reacciones de isomerización. Así, aparecen cinarina y ác. neoclorogénico a partir de los ác. 1,3-dicafeilquínico y clorogénico respectivamente, mientras que aumenta la proporción de monoglucósidos.

Parece claro que, para mantener la composición inicial de la droga, se debe realizar una extracción en medio alcohólico y a baja temperatura. A pesar de ello se ha optado por la utilización de extractos acuosos, ya que todas las preparaciones de alcachofa reputadas como hepatoprotectoras en medicina popular se obtienen en medio acuoso y con elevadas temperaturas, normalmente a ebullición.

2.- REACTIVO BIOLOGICO

En la realización de este estudio se han utilizado ratas Sprague-Dawley, provenientes del estabulario de la Facultad de

Farmacia de la Universidad de Barcelona, con las siguientes características:

Sexo. Dado que la actividad metabólica del sistema microsomal hepático, responsable de la activación tóxica del CCl_4 , varía en función del sexo (JERNIGAN y HARBISON 1982), se han empleado ratas hembras en todos los estudios, salvo para la obtención de hepatocitos aislados.

Peso. Numerosas enzimas alteran su contenido tisular en el transcurso del tiempo (WILSON y col. 1982). Debido a ello, el peso de los animales se ha mantenido, según los experimentos, entre 160-260 g.

Salvo indicación expresa, los animales se mantuvieron hasta el momento de realizar los ensayos con agua "ad libitum" y una dieta standard Panlab A-04 (Agua 12%, proteínas 17%, lípidos 3%, glúcidos 58.7%, celulosa 4.3%, minerales 5%). Se alojaron en jaulas de material plástico (Makrolon, 524x274x150 mm), por lo menos una semana antes de iniciar cada experimento (máximo 10 animales por jaula). La temperatura del estabulario se mantuvo constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), con un ritmo circadiano de luz/oscuridad de 12 horas (8AM/8PM).

3.- DETECCION DE LA LESION HEPATICA INDUCIDA POR CCl_4

El complejo papel que desempeña el hígado dentro del organismo, así como la importancia que presenta la patología hepática en el campo de la medicina humana ha hecho que se desarrolle, en el transcurso de este siglo, una amplia metodolo

gía analítica encaminada a la detección y diagnóstico de las lesiones hepáticas. Aunque el impulso investigador se ha centrado en el campo clínico, su aplicación trasciende al dominio de la Farmacología y Toxicología experimentales. En conjunto, estas técnicas se pueden clasificar en dos tipos predominantes:

Aquellas encaminadas a la detección de la intensidad de la lesión producida en el parénquima hepático.

Aquellas que indican el grado de afectación del funcionalismo hepático.

Respecto a su nivel de aplicación, se dividen en dos grandes grupos:

Técnicas "in vivo"

Son esenciales en la demostración de que un agente tóxico presenta un efecto adverso a nivel hepático de significación fisiológica:

a.- Valoración de la Dosis Letal 50. De rápida ejecución, presenta el inconveniente de ser muy poco específica. Así, por ejemplo, aunque el CCl_4 es un tóxico hepático selectivo, a dosis altas produce la muerte por alteración renal y del SNC, más que por el grado de lesión hepática. Debido a ello, su aplicación es muy restringida.

b.- Examen histológico (Microscopía óptica y electróni

ca). Permite evaluar de forma global el grado de lesión producido, sobre todo a nivel de alteraciones en la arquitectura hepática, extensión de zonas necróticas y esteatosis. Como principales inconvenientes se han de destacar la imposibilidad de realizar una cuantificación exacta de la intensidad de la lesión y, principalmente, el hecho de que "no se puede estar seguro de que la muestra de tejido hepático escogida para el examen histológico sea verdaderamente representativa del órgano en su conjunto" (VOGEL 1977).

c.- Detección y cuantificación de alteraciones en los constituyentes del tejido hepático. Pueden evidenciar la intensidad de la lesión producida (detección de la peroxidación lipídica, niveles de GSH, Cit P450, enzimas tisulares, etc.), así como alteraciones del funcionalismo (niveles de glucógeno, triglicéridos, síntesis proteica, etc.). Todas estas técnicas son de realización compleja, por lo que no se aplican usualmente en una evaluación directa de la lesión hepática.

d.- Cuantificación de parámetros sanguíneos relacionados con el hígado. (RAUEN y SCHRIEWER 1973, GEORGES y col. 1970, KEMENY y col. 1982, SALVE 1983). Este es, probablemente, uno de los campos de mayor utilización, debido a la rapidez de su ejecución y al amplio espectro informativo que proporciona. Se puede subdividir en tres grandes apartados:

d.1.- Parámetros relacionados con la función secretora hepática. El hígado libera al torrente sanguíneo multitud de sustancias, interviniendo activamente en el mantenimiento de la homeostasis del organismo. A su vez, estas sustancias se pueden dividir en dos grupos:

d.1.1.- Sustancias en las que el hepatocito, sin sintetizarlas de una forma exclusiva, interviene directamente en la regulación de sus niveles plasmáticos:

- # Glucosa. Uno de los aspectos de la intervención hepática en el metabolismo glucídico es el del mantenimiento de la glucemia. La glucosa secretada a la sangre es sintetizada en parte por el hígado (a partir de aminoácidos y del glicerol de los triglicéridos) y liberada a partir de las reservas de glucógeno hepático (tras 24 horas de ayuno el glucógeno puede disminuir a un 10% de su valor normal). Un hígado lesionado puede ser incapaz de mantener una glucemia constante tras un período de ayuno, por lo que la cuantificación de la glucosa plasmática en estas condiciones sirve para evaluar el estado funcional de la viscera. En contrapartida, la glucemia es un test bastante inespecífico, debido a la gran cantidad de factores extrahepáticos que intervienen en su regulación.
- # Triglicéridos. Los triglicéridos plasmáticos provienen de dos fuentes mayoritarias: los quilomicrones, resultantes de la absorción de las grasas en el tracto digestivo, y las lipoproteínas (especialmente la fracción VLDL). Al cabo de 6 a 10 horas de ayuno su procedencia es casi exclusivamente hepática. Normalmente se determina el patrón lipoproteico pero, en el caso específico del CCl_4 , dado que produce

una acumulación de triglicéridos en el parén - quima hepático, parece interesante determinar los niveles plasmáticos de estos lípidos como reflejo de la esteatosis producida.

d.1.2.- Sustancias sintetizadas exclusivamente por el hígado. Entre ellas destacan:

- # Proteínas plasmáticas. No sólo las lipoproteínas, sino la albúmina, transferrina, ceruloplasmina, fibrinógeno, protrombina, etc. son sintetizadas directamente por el hepatocito, por lo que su cuantificación es un buen test funcio - nal hepático. Sin embargo, dado el "pool" plasmático existente, su valoración es mucho más significativa en el diagnóstico de lesiones crónicas (FOUAD y col. 1983).
- # Urea. El hígado es el único órgano capaz de sintetizar urea, eliminando los iones amonio provenientes de la degradación aminoacídica. Esta función sólo se ve afectada en casos irreversibles, por lo que no es de gran interés su evaluación.
- # Colesterol. El hígado sintetiza la mayor parte del colesterol orgánico dedicándolo, bien a sus propias necesidades, bien a la exportación a tejidos periféricos, integrado en la fracción lipoproteica. La obstrucción biliar puede conducir a estados hipercolesterolémicos, mientras que una alteración hepatocitaria implicaría ba

jos niveles de colesterol, debidos a un déficit en su síntesis.

d.2.- Pruebas indicadoras del funcionalismo global hepático. Este tipo de pruebas comprende la evaluación del "clearance" de una serie de sustancias, tanto endógenas como exógenas, cuya depuración plasmática está íntimamente ligada al ejercicio coordinado de todas las funciones hepáticas. De entre ellas podemos destacar:

d.2.1.- Sustancias endógenas. Bilirrubina. La bilirrubina se forma en las células del sistema retículo endotelial, por rotura oxidativa del grupo prostético de las hemoproteínas (hemoglobina, citocromos, etc.). Esta bilirrubina es transportada en el plasma unida a la albúmina (bilirrubina libre o indirecta). En el paso hepático es captada por los hepatocitos por un mecanismo desconocido. A nivel microsomal la bilirrubina se somete a un proceso de glucuroconjugación, formándose derivados mono y diglucuroconjugados (bilirrubina directa, soluble en agua). La alteración estructural introducida por la acción enzimática posibilita el acoplamiento del conjugado a transportadores específicos del polo biliar del hepatocito, excretándose así en la bilis (BLANCKAERT 1983). Normalmente no es detectable a nivel sanguíneo.

Las hiperbilirrubinemias pueden deberse a:

- # Incremento en la bilirrubina libre (ictericias hemolíticas).
- # Incremento en la bilirrubina conjugada, típica de fenómenos obstructivos de las vías biliares (intra o extrahepáticas).

Hiperbilirrubinemia mixta, con aumento tanto de la bilirrubina libre como conjugada, típica de lesiones hepatocitarias. Mientras que los otros dos tipos se deben a causas extrahepáticas o de naturaleza mecánica, la hiperbilirrubinemia mixta se produce por afectación de cualquiera de los mecanismos (captación-conjugación-excreción) responsables del metabolismo hepático de la bilirrubina, por lo que su evaluación es de gran ayuda diagnóstica.

d.2.2.- Sustancias exógenas.

Colorantes. El representante más típico de este tipo de sustancias es un compuesto, de naturaleza aniónica, la bromosulfoftaleína (BSP). Introducida en el compartimento vascular, la BSP se une a la albúmina plasmática, siendo vehiculada hasta el hígado. En él, los hepatocitos realizan un complejo proceso que conduce a la eliminación de la BSP por la bilis, de una forma prácticamente total. Intervienen varias fases (CAGEN y KLAASEN 1982):

- . Captación selectiva de la BSP por parte de los hepatocitos, por mecanismos desconocidos.

- . Acumulación de la BSP en el citosol hepatocitario. En este almacenamiento la BSP se une a una serie de proteínas entre las que destaca la ligandina. Se ha comprobado que esta

proteína presenta actividad glutathion transferasa, por lo que la BSP es conjugada con glutathion, disminuyendo así su toxicidad (STOHS y col 1982).

. Excreción selectiva de la BSP a la bilis. La velocidad de excreción es mucho menor que la de captación plasmática, siendo ésta la causa de la acumulación de BSP en el interior del hepatocito.

Por tanto, en la eliminación de BSP no sólo influye el estado de las vías biliares, sino el aporte sanguíneo y, principalmente, la masa funcional hepática. Es por ello que la determinación del "clearance" plasmático de la BSP es un test de elección en el diagnóstico de las afecciones hepáticas. Quizás el mayor inconveniente sea su realización. Existen otros colorantes, como el rojo de Bengala y el verde de indocianina, de menor aplicación.

Fármacos. Ya se ha comentado que el hígado es el órgano responsable, mayoritariamente, de la degradación metabólica de todas aquellas sustancias extrañas que ingresan en nuestro organismo. En esta característica se basa el test denominado "tiempo del sueño por barbitúricos". Dado que estos fármacos se metabolizan en el hígado, aquellos animales que presenten lesiones hepáticas verán prolongado el tiempo de sue

ño inducido, debido a la permanencia más prolongada del barbitúrico en sus organismos. En la actualidad, el avance de la metodología analítica ha posibilitado técnicas más sofisticadas, en las que se valoran los metabolitos en sangre (PELLEGRIN y LESNE 1983, FREDJ y ROUSSELET 1983) u orina. En cualquier caso, la aplicación de este tipo de pruebas permite una correcta evaluación de los sistemas detoxificantes hepáticos.

d.3.- Parámetros indicadores del grado de lesión celular. Una de las funciones que ejerce la membrana plasmática es la de formar una barrera física entre el medio intra y extracelular. De esta manera los integrantes celulares (y entre ellos los enzimas) quedan concentrados en el microambiente propio de la célula. De este hecho se desprende que cualquier circunstancia que provoque una disrupción en la membrana plasmática producirá, de forma indirecta, una liberación de enzimas celulares al medio externo. Por tanto, la detección de niveles plasmáticos anormales de enzimas hepatocitarios es un indicador fidedigno de lesión hepática, traducida en una destrucción celular.

La amplia dotación enzimática hepática permite utilizar un gran número de enzimas como test de diagnóstico. En conjunto, éstos se pueden clasificar en tres grupos bien diferenciados:

Enzimas indicadores de estasis biliar. Cualquier fenómeno que comporte una acumulación anormal de sales

biliares en el hígado inducirá una destrucción hepatocitaria, por ataque directo de los ácidos biliares sobre los lípidos integrantes de la membrana plasmática. Esta "digestión" de la membrana celular comporta la liberación de enzimas integrados en su estructura, entre los que destacan por su valor diagnóstico la fosfatasa alcalina AP (KAPLAN y BRUNSILVER 1975) y la γ -glutamyl transferasa γ -GT (RUPPIN y col. 1982).

En la rata, la AP es un test menos sensible que en el hombre. Sin embargo, el hecho de que el CCl_4 afecte también al sistema renal, junto al elevado contenido de γ -GT en los riñones, aconsejan la utilización de la AP como test de diagnóstico de la lesión hepática inducida por CCl_4 en la rata.

Enzimas indicadores de citolisis. De entre ellos podemos citar la malato deshidrogenasa (MDH), lactato deshidrogenasa (LDH), ornitina carbamoiltransferasa (OCT), glutámico deshidrogenasa (GLDH) y, especialmente, el grupo de las transaminasas. La aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT) son, con diferencia, utilizadas mayoritariamente en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas por dos razones:

- . Su sensibilidad. La ALT es casi exclusivamente hepatocitaria, por lo que su elevación comporta siempre una lesión hepática. La AST se encuentra también en el músculo cardíaco, pero las lesiones de este órgano producen elevaciones menos acentuadas. Por otra parte, la relación existente entre los niveles de ambas es un buen indicador del tipo de lesión producida.

En casos de poca gravedad los niveles de ALT son mayores que los de AST; por el contrario, cuando la lesión alcanza intensamente a un gran número de células (como es el caso de las hepatitis tóxicas), el patrón se invierte.

- . Su distribución celular. La ALT es de localización citosólica, mientras que la AST es un enzima bilocular, encontrándose tanto en el citosol como en las mitocondrias. Así, el perfil enzimático detectado indica el nivel celular alcanzado por la lesión. Estos datos pueden completarse con la detección de enzimas exclusivamente mitocondriales, como la GLDH.

Enzimas cuyos niveles disminuyen en el transcurso de las enfermedades hepáticas. En este grupo se incluye la colinesterasa hepática o pseudocolinesterasa (CHE). La CHE es el único enzima indicador del estado funcional del hígado, debido a que es el propio hepatocito el encargado de sintetizarlo y liberarlo a la sangre.

Aunque la valoración de enzimas plasmáticos es uno de los test de diagnóstico más rápido y fiable, existen limitaciones importantes en su utilización.

Los niveles enzimáticos del plasma pueden incrementarse por alteraciones en la permeabilidad celular no debidas a las manifestaciones específicas del agente tóxico, sino a la respuesta general desencadenada en el organismo (colapso vascular, anoxia, etc.).

Como ya se ha indicado en el caso de la γ -GT y la AST, un gran número de enzimas se localizan en diversos tejidos orgánicos, por lo que su elevación plasmática no tiene que indicar, necesariamente, una lesión hepática.

No todas las afecciones hepáticas que comportan una alteración celular cursan con modificaciones significativas en los niveles enzimáticos sanguíneos (etionina, fósforo). En general, la magnitud del aumento en la actividad enzimática no se corresponde exactamente con la gravedad de la lesión celular. Si ésta es leve pero extensa, afectando a casi todos los hepatocitos, los niveles enzimáticos serán muy elevados, más que en el caso de lesiones graves, pero restringidas.

Técnicas "in vitro"

Comportan la utilización de hígado perfundido, hepatocitos aislados, fracciones subcelulares (mitocondrias, microsomas), etc. Su aplicación se restringe al campo de la investigación experimental, en el estudio de los posibles mecanismos responsables de las manifestaciones tóxicas.

Quizás, una de las conclusiones más importantes que derivan del estudio del cúmulo de métodos diagnósticos es el hecho de que no existe ninguna técnica que refleje al 100% el estado del hígado lesionado. Por ello, el diagnóstico de cualquier hepatopatía comporta la utilización de un conjunto de pruebas, siendo la interpretación global de todos los resulta

dos obtenidos la que puede visualizar de una forma precisa el grado de afectación hepática.

Capítulo I. Acción Farmacológica de un
extracto acuoso de
Cynara scolymus L.

1.- OBTENCION DEL EXTRACTO ACUOSO

En esta primera parte del estudio se ha valorado la posible actividad hepatoprotectora de un extracto acuoso (EA) de Cynara scolymus L. Para su obtención se ha realizado el siguiente proceso (Fig. IV):

100 g de limbos foliares desecados se someten a ebullición a reflujo, con 1 l de agua destilada, durante 4 horas.

Una vez enfriado el decocto, se filtra y el marco se somete a un nuevo proceso de extracción, durante 2 horas, con 0.5 l de agua destilada. A continuación se reúnen los líquidos extractivos, previamente filtrados, obteniéndose el EA.

Para su conservación, el extracto se concentró a presión reducida y se liofilizó (liofilizador Telstar).

2.- VIA DE ADMINISTRACION. TOXICIDAD

Se consideraron dos posibles vías de administración:

Oral (p.o.), como vía usual en la utilización práctica de la alcachofa como droga.

Intraperitoneal (i.p.), vía alternativa con una mayor eficacia en la absorción de principios activos.

Para determinar las dosis a administrar se realizó un estudio previo de toxicidad aguda, según el método de REED MUENCH y PIZZI (1950).

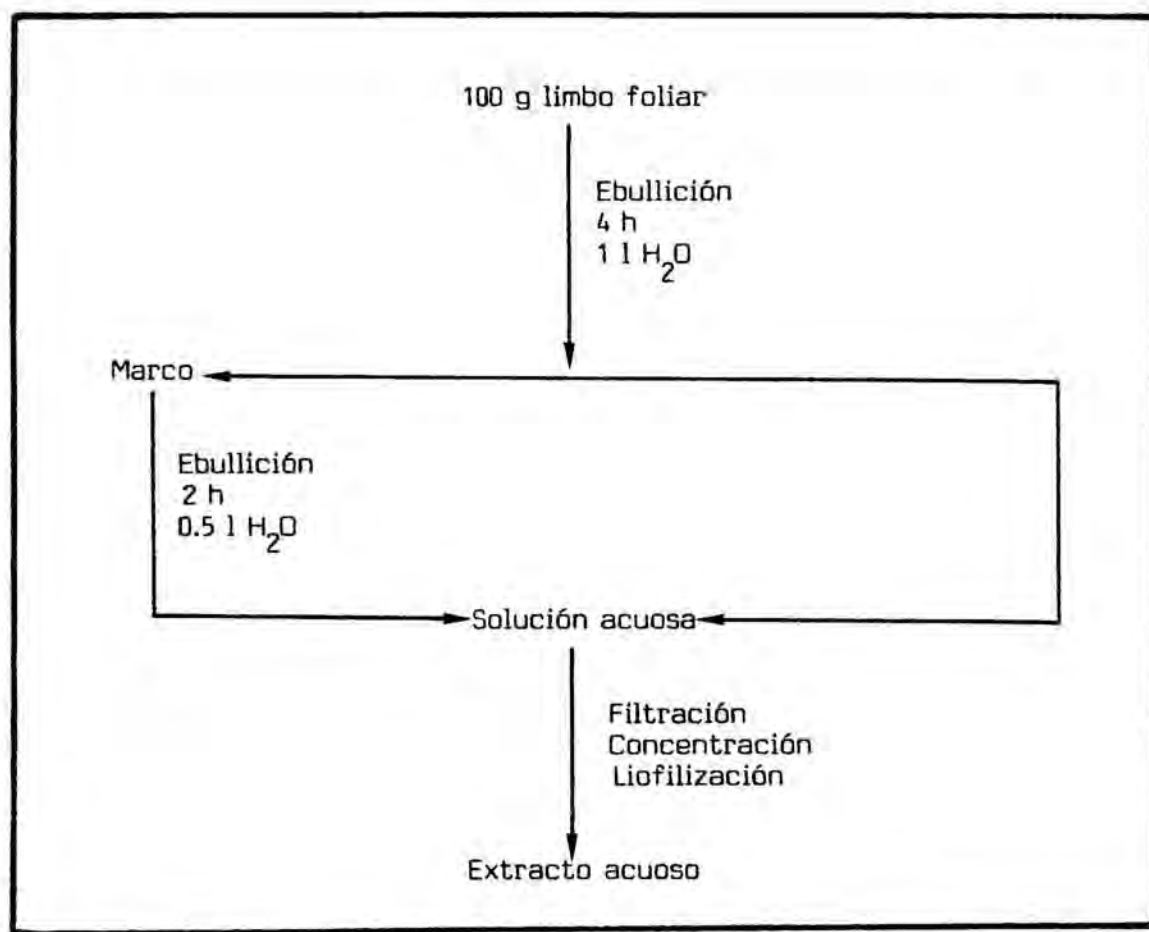


Fig. IV: Obtención del extracto acuoso.

Via oral (p.o.)

Se utilizaron 60 animales (200 ± 17 g), divididos en 6 grupos de 10 animales cada uno, a los que se administró dosis crecientes de EA (700, 850, 1000, 1250, 1500 y 2000 mg/Kg).

Todos los animales permanecieron en ayuno, con agua "ad libitum", 10 horas antes de la administración del extracto y durante todo el período de observación (48 horas).

En este tiempo no se produjo ninguna muerte ni se apreciaron signos externos de afectación.

Vía intraperitoneal (i.p.)

Se utilizaron 66 animales (210 ± 20 g), divididos en 11 grupos de 6 animales cada uno, realizando el estudio de toxicidad aguda en las mismas condiciones que en el caso anterior. Los resultados se expresan en la tabla I.

Dosis (mg/Kg)	n° de animales	Muertos	Vivos
1000	6	6	0
900	6	6	0
850	6	6	0
800	6	3	3
750	6	2	4
700	6	1	5
600	6	0	6
500	6	0	6
400	6	0	6
200	6	0	6
100	6	0	6

Tabla I

En la tabla II se indican los valores utilizados para el cálculo de la DL_{50} . Se obtiene una recta de regresión de ecuación:

$$\% \text{ Mortalidad} = A + B \times \text{Dosis}$$

$$A = -259, \quad B = 0.429, \quad r = 0.984$$

Dosis (mg/Kg)	n°	Vivos	Muertos	Acumulados V M		Total	% Mortalidad
600	6	6	0	12	0	12	0.0
700	6	3	3	6	3	9	33.3
750	6	2	4	3	7	10	70.0
800	6	1	5	1	12	13	92.3
850	6	0	6	0	18	18	100.0

Tabla II

El 50% de mortalidad corresponde a una dosis de 718 mg/Kg

En todos los casos se observó:

Contracciones abdominales y de extremidades, similares a las producidas por ác. acético vía i.p. en el test de Koster, al cabo de 10 minutos de la administración del extracto.

Aparición de una intensa ascitis a las 24 horas, incluso a dosis que no producen ninguna mortalidad.

El pH del extracto es de carácter ácido, oscilando entre valores de 5.4-5.6, lo que podría explicar las manifestaciones tóxicas apreciadas.

En función de los resultados obtenidos y dada la toxicidad presentada por vía i.p., se eligió la vía oral como idónea para la realización del estudio.

3.- DETERMINACION DE PARAMETROS SANGUINEOS

3.1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se dispuso de 61 animales (240 ± 20 g), divididos en los siguientes grupos:

Grupo Control (10 animales): Dosis de 5 ml/Kg de aceite de oliva, p.o.

Grupo Intoxicado (17 animales): Dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 20% V/V en aceite de oliva. (p.o.)

Grupo Tratado I (17 animales): Administración preventiva de 150 mg/Kg de EA (p.o.) una hora antes de realizar la intoxicación con CCl_4 .

Grupo Tratado II (17 animales): Administración preventiva de 500 mg/Kg de EA (p.o.) una hora antes de la intoxicación.

En todos los casos, a fin de minimizar la influencia de los ritmos circadianos, se administró el extracto a la misma hora del día (15.00 h). Tras la intoxicación (16.00 h), los animales permanecieron en ayuno, con agua "ad libitum", durante 24 horas, procediendo a continuación a la obtención del plasma.

3.2.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS

La sangre se ha extraído mediante canulación de la arteria carótida común. Para ello, una vez anestesiado el animal

(solución acuosa al 10% de etil uretano, 10 ml/Kg i.p.), se es cinde la piel del cuello y se practica traqueotomía, impidiendo la obstrucción de las vías respiratorias. Con unas pinzas se separan las capas musculares y se visualiza la arteria carótida común, caracterizada por su tono rosado y por su latido. Una vez limpia de adherencias y separada del nervio vago, se anuda, mediante sutura quirúrgica, por la parte craneal y se pinza por su extremo cardial. A continuación se practica una incisión en la arteria, introduciendo una cánula de material plástico (\varnothing 1 mm), por la que se inyectan 0.25 ml de heparina sódica (1000 UI/ml). Transcurrido 1 minuto, se recoge la sangre sobre tubos de plástico de 10 ml.

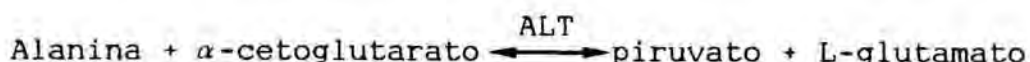
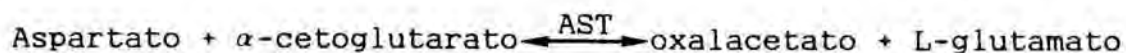
El plasma se separa por centrifugación (5 min, 2000 x g), como máximo 1 hora después de la extracción sanguínea. Para evitar procesos de hemólisis, que interfieren en algunas determinaciones, se utilizaron cánulas y tubos desechables.

Todos los parámetros, específicamente las bilirrubinas, se determinaron en el mismo día de la extracción. En los casos en que no fue posible el plasma se conservó en tubos cerrados a -20 °C, durante 6 días como máximo (CUCCHERINI y col 1983).

3.3.- PARAMETROS ESTUDIADOS. METODO DE VALORACION

Aspartato aminotransferasa AST (E.C. 2.6.1.1.) y Alani-
na aminotransferasa ALT (E.C. 2.6.1.2). Método colorimétrico

Catalizan las siguientes reacciones:



La técnica utilizada para la valoración de la actividad de estos dos enzimas se basa en un método colorimétrico. Consiste en la cuantificación, a 546 nm, de la intensidad de color producida por las hidrazonas formadas en la reacción entre la 2,4-dinitrofenilhidrazina con oxalacetato (AST) o piruvato (ALT), a 37 °C.

Fosfatasa alcalina AP (E.C. 3.1.3.1.). Método colorimétrico

Este enzima, que hidroliza ésteres monofosfóricos, es bastante inespecífico, actuando sobre gran cantidad de sustratos. Su valoración se fundamenta en la determinación, a 405 nm, de la intensidad del color producido por el p-nitrofenol, liberado por la acción del enzima sobre el p-nitrofenolfosfato. La incubación se realiza a 37 °C.

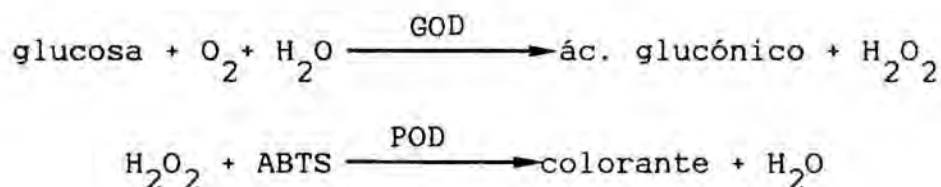
Bilirrubina total BT y directa BD. Método Jendrassik-Grooff

La copulación, en presencia de cafeína, de la bilirrubina

na con el ácido sulfanílico diazotado forma un colorante azoico de tonalidad rosada. La intensidad del color producido se mide a 578 nm. La valoración de la bilirrubina directa se realiza en ausencia de cafeína, con lo que la bilirrubina no conjugada, insoluble, no reacciona. En este caso, la lectura se efectúa a 546 nm.

Glucosa G. Método GOD-Perid

Se determina, a 610 nm, la intensidad de color producida por el colorante formado en el proceso:



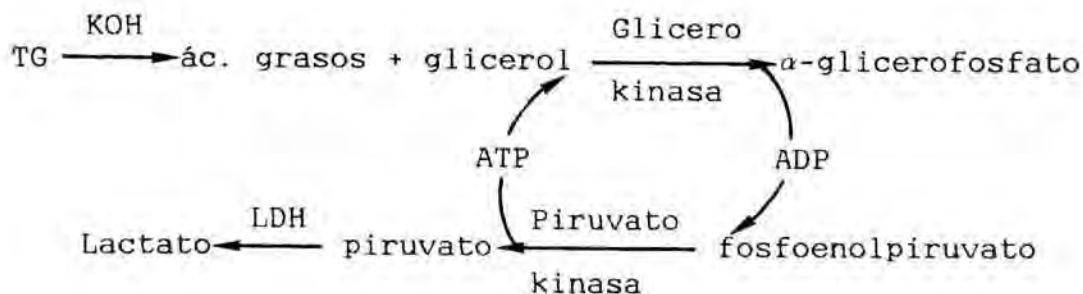
GOD = Glucosa oxidasa

POD = Peróxido dismutasa

ABTS = 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-(6)-)-sal dianiónica.

Triglicéridos TG. Test UV

La cuantificación de los triglicéridos plasmáticos se realiza por un método indirecto, valorando la disminución de absorbancia, a 340 nm, producida en el medio por desaparición del NADH_2 en la siguiente cascada de reacciones:



3.4.- REACTIVOS Y MATERIAL UTILIZADO

Los reactivos utilizados en este trabajo y la firma comercial de procedencia son los siguientes:

Panreac : NaCl, KOH, Etanol absoluto.

Fluka : Etil uretano.

Lab. Leo : Heparina, sal sódica.

Boehringer Mannheim : Kits para la determinación de AST, ALT, AP, BD, BT, G y TG.

En el control de la precisión y exactitud de los mismos se han utilizado sueros control Preci-norm y Precipath.

Las determinaciones de absorbancia se han efectuado en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 550 S UV/VIS.

3.5.- RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados se ha lleva-

do a cabo por el test de la t de Student para grupos no pareados (TALLARIDA y MURRAY 1981). Para algunos parámetros se ha utilizado el cálculo logarítmico, a fin de corregir la distribución no gaussiana de los mismos (PERRISSOUD y WEIBEL 1980).

Los resultados se expresan en la tabla III, indicando únicamente la media y los límites del error standard de la media ($p < 0.05$).

4.- "CLEARANCE" DE LA BROMOSULFOFTALEINA

4.1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se utilizaron 20 animales (200 ± 30 g) repartidos en 4 grupos de 5 animales cada uno (Control, Intoxicado, Tratado I y Tratado II), con tratamiento idéntico al descrito para la valoración de los parámetros sanguíneos.

4.2.- METODO DE VALORACION

La evaluación del "clearance" plasmático de la bromosulfoftaleína (BSP) se ha realizado según el método de MOLINO y col. (1982), determinando los parámetros K_5 (desaparición de BSP a los 5 minutos) y R_{15} (retención de BSP a los 15 minutos), tras la administración intravenosa del colorante al animal de experimentación.

Los valores de K_5 reflejan el aporte sanguíneo hepático y la captación de BSP por los hepatocitos, mientras que los va

	Control			Intoxicado			Tratado I			Tratado II		
	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n	\bar{x}
AST (U/l)	10	48 (42- 54)	17	1119 (787- 1590)	16	974 (637- 1488)	16	1190 (850- 1666)	16	1190 (850- 1666)	16	1190 (850- 1666)
ALT (U/l)	10	12 (10- 14)	17	384 (246- 597)	16	353 (203- 612)	16	382 (287- 507)	16	382 (287- 507)	16	382 (287- 507)
AP (U/l)	10	79 (67- 93)	17	82 (70- 96)	16	82 (70- 96)	16	82 (70- 96)	16	82 (70- 96)	16	82 (70- 96)
BT (μ Mol/l)	9	2.41 (1.47- 3.96)	16	26.69 (20.20-35.27)	16	28.56 (22.12-36.89)	15	26.05 (21.18-32.04)	15	26.05 (21.18-32.04)	15	26.05 (21.18-32.04)
BD (μ Mol/l)	10	-----	16	11.75 (7.62-18.12)	16	14.60 (10.24-20.81)	16	13.38 (10.33-17.34)	16	13.38 (10.33-17.34)	16	13.38 (10.33-17.34)
G (μ Mol/l)	10	10.46 (9.09-12.03)	17	9.40 (8.60-10.28)	16	9.27 (8.53-10.08)	15	9.24 (8.20-10.41)	15	9.24 (8.20-10.41)	15	9.24 (8.20-10.41)
IG (mMol/l)	10	0.436 (0.351-0.542)	17	0.711 (0.576-0.878)	16	0.922 (0.753-1.129)	15	0.576 (0.400-0.830)	15	0.576 (0.400-0.830)	15	0.576 (0.400-0.830)

a.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al grupo Control

b.- Diferencia no significativa respecto al grupo Control

c.- Diferencia no significativa respecto al grupo intoxicado

d.- Diferencia significativa para $p < 0.05$ respecto al grupo intoxicado

e.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al grupo intoxicado

Tabla III

lores de R_{15} dependen, esencialmente, de varios factores: la actividad excretora biliar, el reflujo de BSP en sangre y la masa funcional hepática.

La BSP se administra por la vena femoral, de la siguiente forma:

Al animal anestesiado y traqueotomizado se le depila una de las zonas inguinales, efectuando una incisión en la piel y separando las diferentes capas de tejidos, hasta visualizar la vena femoral. Una vez aislada ésta, se pasa una sutura doble y se ata su parte distal, realizando una incisión en la parte más próxima al punto donde se ha efectuado la ligadura. A continuación, se introduce una cánula de material plástico (\emptyset 0.5 mm) y se inyecta la BSP (dosis de 4 mg/Kg).

Las muestras de sangre se obtuvieron por canulación de la arteria carótida común (ver apartado 3.2.), a los tiempos 2, 3, 5, 10, 15 y 20 minutos. Se consideró como tiempo 0 el momento de la administración de BSP. Previamente se extrajo una muestra para la realización del blanco.

A fin de mantener la volemia constante se inyectó por la vena femoral un volumen de suero fisiológico (NaCl 145 mM) igual al de sangre obtenido en cada tiempo.

El cálculo de los parámetros K_5 y R_{15} se efectúa en función de las ecuaciones:

$$K_5 = \frac{\ln C_0 - \ln C_5}{5} \quad R_{15} = \frac{C_{15} - 100}{C_0}$$

Donde:

C_0 = Concentración plasmática de BSP a los 0 minutos

C_5 = Concentración plasmática de BSP a los 5 minutos

C_{15} = Concentración plasmática de BSP a los 15 minutos

El "clearance" de BSP presenta dos fases bien diferenciadas. Los valores de C_0 , C_5 y C_{15} se obtienen a partir del análisis de las rectas de regresión de estas dos fases.

Para la determinación de la concentración de BSP se centrifugan las muestras y se toman 0.1 ml de plasma, completando hasta 1 ml con NaOH 0.1 N. La BSP en solución alcalina presenta un color rojo-violeta, cuya absorbancia se valora a 575 nm frente a un blanco.

A fin de establecer una relación entre la absorción y la concentración de BSP, se realizó una curva patrón a partir de soluciones de BSP de concentración conocida (Tabla IV).

BSP ($\mu\text{g/ml}$)	Lecturas				
	1ª	2ª	3ª	4ª	\bar{x}
0.975		0.083	0.082	0.080	0.081
1.950		0.168	0.160	0.157	0.161
3.900	0.302	0.325	0.329	0.319	0.318
7.800	0.616	0.673	0.662	0.639	0.647
15.600	1.236	1.267	1.326	1.269	1.274

Tabla IV

$$\text{Absorbancia} = A + B \times \mu\text{g BSP/ml}$$

$$A = 0.002 \quad B = 0.081 \quad r = 0.999$$

La valoración de las soluciones de BSP (Merck) se realizó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 550 S UV/V.

4.3.- RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados se ha llevado a cabo según lo indicado en el apartado 3.5.

En las tablas V, VI, VII y VIII se expresan los resultados individuales para los grupos Control, Intoxicado, Tratado I y Tratado II, respectivamente. En la tabla IX aparecen los valores medios de K_5 y R_{15} para cada grupo.

T	$\mu\text{g BSP/ml}$				
2	40.6	23.9	29.0	26.0	43.7
3	25.0	16.6	17.6	14.5	24.4
5	9.4	6.6	8.8	3.5	9.0
10	5.1	1.4	4.2	0.0	1.2
15	1.3	0.6	1.7	0.0	0.8
20	0.9	0.3	1.0	0.0	0.5
K_5	0.487	0.436	0.390	0.674	0.522
R_{15}	1.681	1.027	3.140	0.000	0.577

Tabla V. Grupo Control

T	$\mu\text{g BSP/ml}$				
2	127.3	119.8	109.8	106.2	97.6
3	77.6	102.8	96.5	86.5	76.7
5	64.7	83.2	64.7	48.1	48.6
10	44.6	64.8	44.9	23.3	25.3
15	42.6	54.8	21.0	10.1	22.6
20	30.2	48.2	16.7	9.7	22.1
K_5	0.206	0.119	0.179	0.268	0.231
R_{15}	22.509	37.009	15.617	7.069	15.067

Tabla VI. Grupo Intoxicado

T	$\mu\text{g BSP/ml}$				
2	106.9	93.0	104.7	96.0	101.2
3	86.6	76.2	85.3	82.1	81.6
5	68.3	60.3	59.7	67.6	67.5
10	50.0	48.9	48.1	53.7	50.8
15	44.0	40.4	41.0	47.5	41.2
20	40.1	36.1	38.5	36.4	35.2
K_5	0.144	0.133	0.186	0.114	0.129
R_{15}	32.041	35.056	28.122	38.111	33.076

Tabla VII. Grupo Tratado I

T	$\mu\text{g BSP/ml}$				
2	90.9	120.8	112.7	140.1	112.0
3	64.1	107.7	98.0	121.6	90.2
5	41.1	72.7	66.7	94.5	70.3
10	30.4	55.7	57.4	73.9	48.4
15	25.7	45.6	51.5	52.3	23.6
20	20.4	40.2	39.0	33.7	21.4
K_5	0.258	0.173	0.176	0.130	0.151
R_{15}	17.105	26.667	29.880	28.002	19.620

Tabla VIII. Grupo Tratado II

	K_5			R_{15}		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	5	0.501	± 0.108	5	1.285	± 1.205
Intoxicado	5	0.200 ^a	± 0.056	5	19.454 ^a	± 11.234
Tratado I	5	0.141 ^c	± 0.027	5	33.281 ^d	± 3.697
Tratado II	5	0.177 ^b	± 0.048	5	24.256 ^b	± 5.571
<p>a.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al grupo Control</p> <p>b.- Diferencia no significativa respecto al grupo Intoxicado</p> <p>c.- Diferencia significativa para $p < 0.05$ respecto al grupo Intoxicado</p> <p>d.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al grupo Intoxicado</p>						

Tabla IX

5.- ESTUDIO HISTOLOGICO

Para el estudio histológico se ha escogido una coloración topográfica, como la Hematoxilina-Eosina, que permite una visión de conjunto de la estructura hepática, apreciándose las distorsiones arquitectónicas originadas por la lesión tisular.

5.1.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Las muestras histológicas se consiguieron a partir de los animales utilizados en la valoración de los parámetros sanguíneos (3-4 animales por grupo). Una vez desangrados, se incidió la cavidad abdominal y se extirpó el hígado, introduciéndolo en una cápsula de Petri con suero fisiológico a fin de eliminar restos hemáticos.

Las piezas de tejido, de un grosor no superior a los 5-6 mm, se obtuvieron del lóbulo hepático izquierdo. Para conseguir una mayor homogeneidad, los cortes se realizaron siempre a unos 2 cm de la periferia del mismo.

5.2.- PROCESO DE TINCION

Para la elaboración y posterior tinción de los cortes histológicos se diseñó el siguiente protocolo:

Fijación de las estructuras celulares y tisulares

La muestra se introduce rápidamente en el líquido fijador, Picroformol o líquido de Bouin, compuesto por:

Solución acuosa saturada de ác. pícrico.....	30 vol.
Formol al 40%.....	10 vol.
Ac. acético glacial.....	2 vol.

El volumen de líquido es, aproximadamente, de 30-40 veces el de la muestra, para favorecer la impregnación del tejido. El tiempo de fijación óptimo ha sido de 15 horas. Finalizada la fijación, las piezas se lavan durante 24 horas con agua corriente y se introducen en líquido conservador (etanol de 70°) hasta el momento de la inclusión.

Inclusión

Consta de las siguientes fases:

Deshidratación. Las piezas se introducen sucesivamente en:

Alcohol isopropílico de 90°.....	3½-4 horas
Alcohol isopropílico absoluto.....	3 horas

Impregnación en parafina. Se realiza en estufa, a una temperatura superior en 1-2 °C a la temperatura de fusión de la parafina (58 °C), durante 4-6 horas. Es conveniente utilizar baños sucesivos de parafina, a fin de desplazar

completamente el alcohol isopropílico.

Confección del bloque de parafina sólida, según el procedimiento usual.

Obtención de los cortes

Se utilizó un microtomo de cuchilla fija Reichert, consiguiéndose cortes de 5 a 7 μm de espesor. Estos se introducen en un cristizador con agua termostatada a 40 °C, con lo que se extienden perfectamente y se pueden recoger sobre un portaobjetos. Como sustancia adherente se utilizó la albúmina de Mayer (mezcla, a partes iguales, de clara de huevo filtrada y glicerina, con unas gotas de formol).

Previamente a la tinción, los portaobjetos se introducen en una estufa a 35 °C durante 5 horas, eliminando el agua retenida.

Rehidratación de los cortes

Los portaobjetos se sumergen, sucesivamente, en:

Xilol.....	30 minutos
Etanol absoluto.....	10 minutos
Etanol de 90°.....	10 minutos
Agua destilada.....	10 minutos

Tinción de los cortes

El proceso de tinción está constituido por:

Hematoxilina de Delafield.....	5 minutos
Lavado con agua.....	15 minutos
Agua destilada.....	2 minutos
Eosina (solución acuosa al 1%).....	5 minutos
Etanol de 90°.....	5 minutos
Etanol Absoluto.....	5 minutos
Esencia de Eucaliptus.....	15 minutos
Xilol.....	2-3 minutos
Montaje con D.P.X.	

La Hematoxilina de Delafield se prepara de la siguiente forma:

Hematoxilina.....	4 g	Solución A
Etanol Absoluto.....	25 ml	
Sulfato aluminico amónico....	40 g	Solución B
Agua destilada.....	400 ml	

Se mezclan ambas soluciones y, al cabo de 5 días, se añaden:

Glicerina.....	100 ml
Metanol.....	100 ml

Trascurridos 5 días se filtra la solución, quedando pre

parada para su utilización. En el momento del uso se mezcla con agua destilada (1:1 V/V) y se filtra de nuevo.

5.3.- RESULTADOS

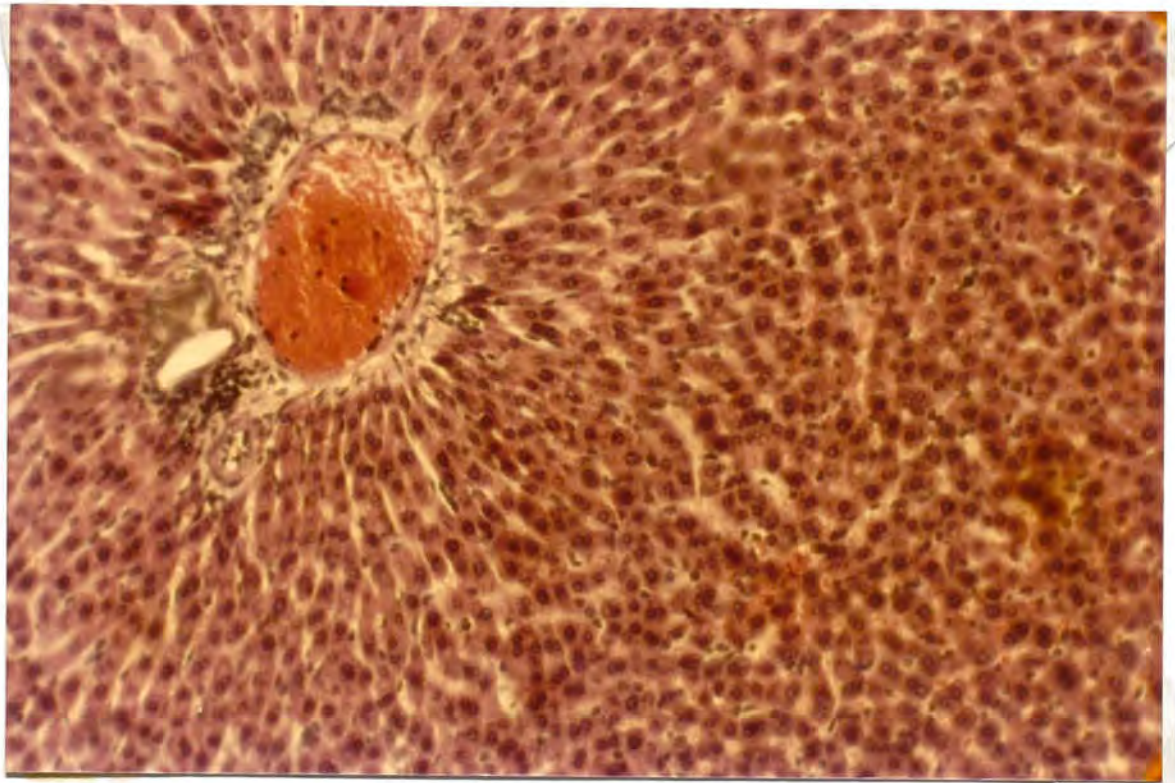
Con la tinción Hematoxilina-Eosina se observan los núcleos celulares de un color azulado, mientras que el citoplasma y las fibras de colágeno quedan con diferentes tonalidades rosadas.

Para el estudio de las preparaciones histológicas, así como para la realización de las fotografías, se utilizó un microscopio óptico Standard 16 Carl Zeiss, con cámara MC 63.

A continuación se muestran fotografías, a 100x aumentos, obtenidas de preparaciones provenientes de cada uno de los grupos estudiados.

La fotografía I pertenece a un animal control. En su parte izquierda se observa un espacio porta, constituido por ramificaciones de la vena porta, arteria hepática y un canalículo biliar. Los hepatocitos se disponen radialmente a partir del espacio porta, presentando el parénquima un aspecto homogéneo y ordenado.

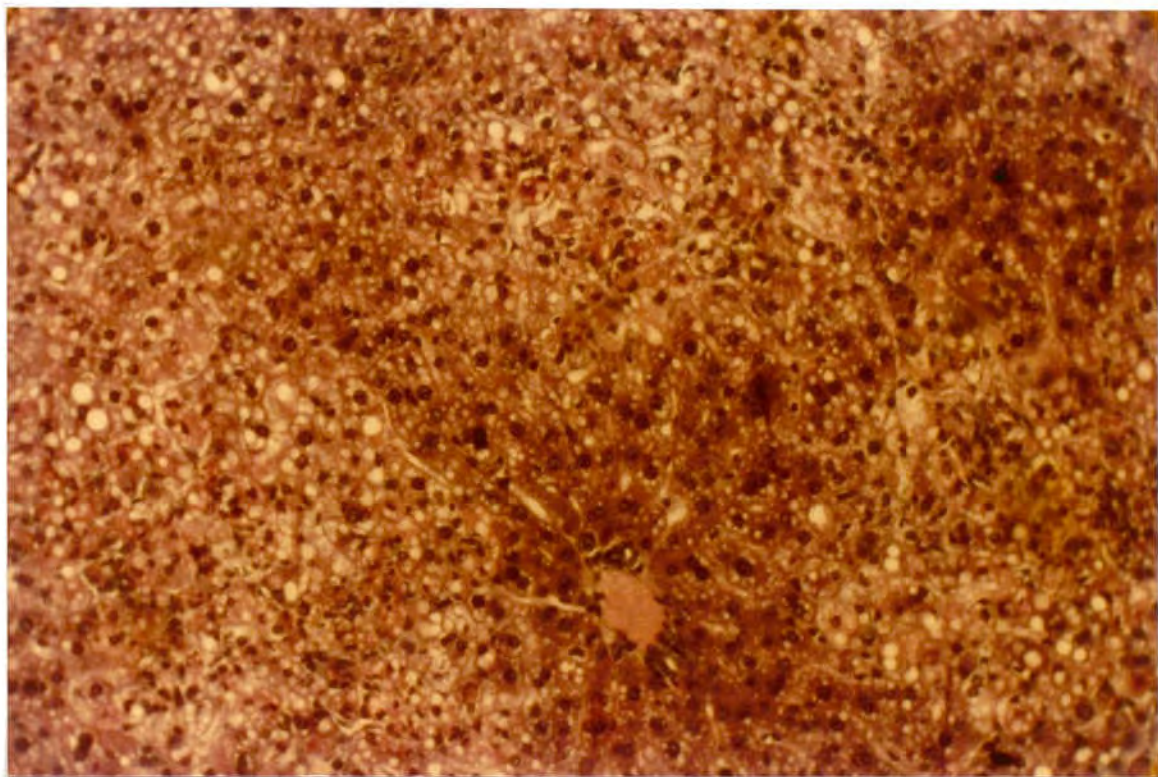
En la fotografía II se visualiza una zona similar pero correspondiente a un animal intoxicado. La zona media y periférica a partir del espacio porta sufre una desorganización total de la estructura parenquimática, debida a la instauración de una necrosis generalizada. Asimismo, se aprecia la existencia de una esteatosis difundida por todo el tejido, en forma de pequeñas gotículas de grasa presentes en todas las



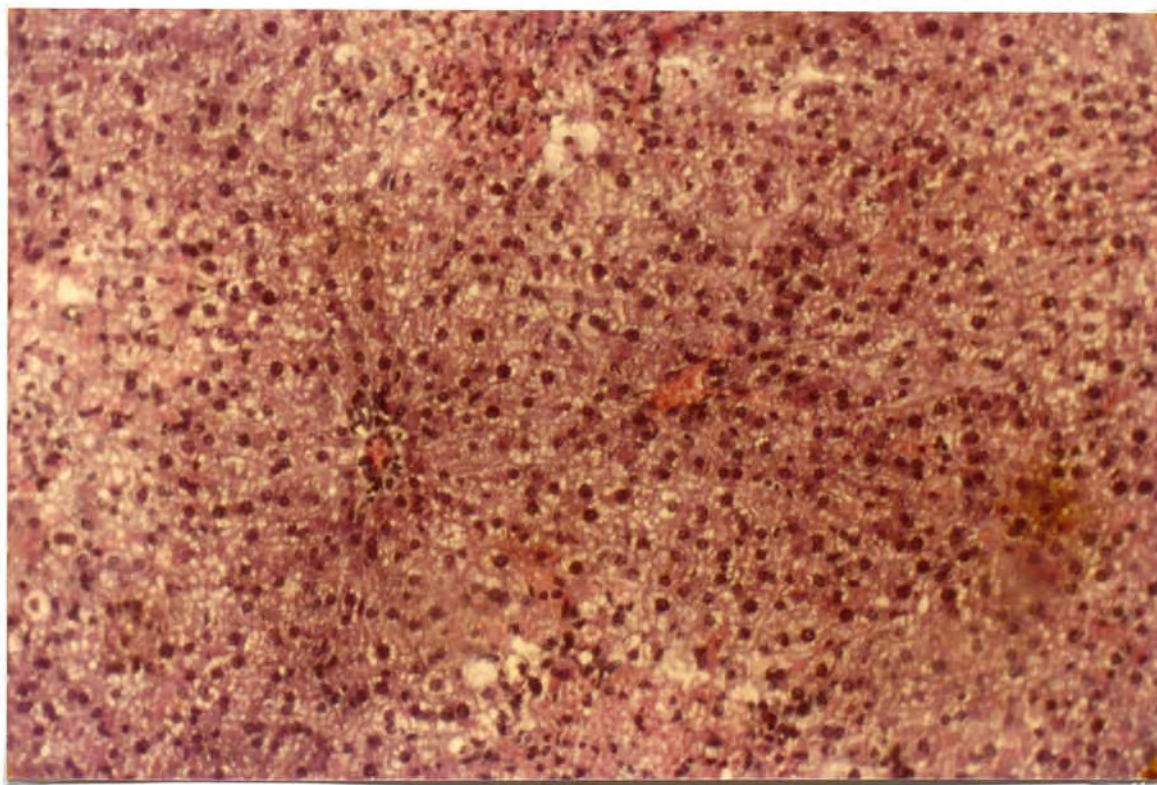
Fotografía I. Grupo Control

células. En algunos casos, estas gotículas se han fusionado, formando quistes que pueden llegar a destruir el hepatocito que los alberga. Incluso en la zona que rodea el espacio porta, la más preservada, aparecen depósitos grasos. En conjunto, se muestra un cuadro típico de lesión centrolobulillar inducida por el CCl_4 .

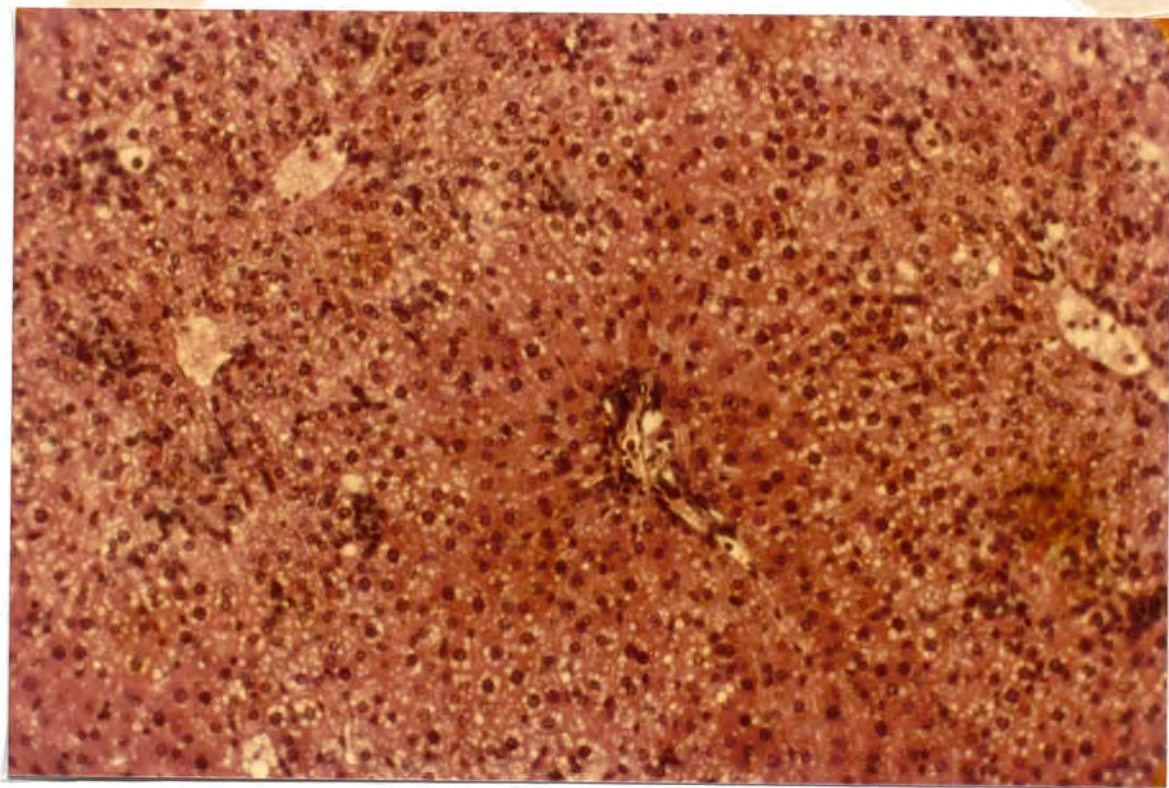
Las fotografías III y IV proceden de animales pertenecientes a los grupos Tratado I y II, respectivamente. Como se puede apreciar, no se observa ninguna diferencia con respecto al patrón histopatológico descrito para el grupo Intoxicado.



Fotografía II. Grupo Intoxicado



Fotografía III. Grupo tratado I



Fotografía IV. Grupo Tratado II

6.- DISCUSION

La administración de una dosis única de CCl_4 (5 ml/Kg, CCl_4 al 20% en aceite de oliva) produce un cuadro típico de hepatitis tóxica aguda. Como rasgos más característicos de esta lesión, podríamos destacar:

Una elevación acusada en los niveles de AST y ALT plasmáticos, indicadores de una extensión generalizada del daño hepatocelular (Fig. V). Asimismo, el hecho de que la relación AST/ALT sea superior a la unidad (≈ 3) indica la intensidad de la lesión, afectando el CCl_4 a la membrana mitocondrial y provocando la liberación de la AST contenida en esta organe

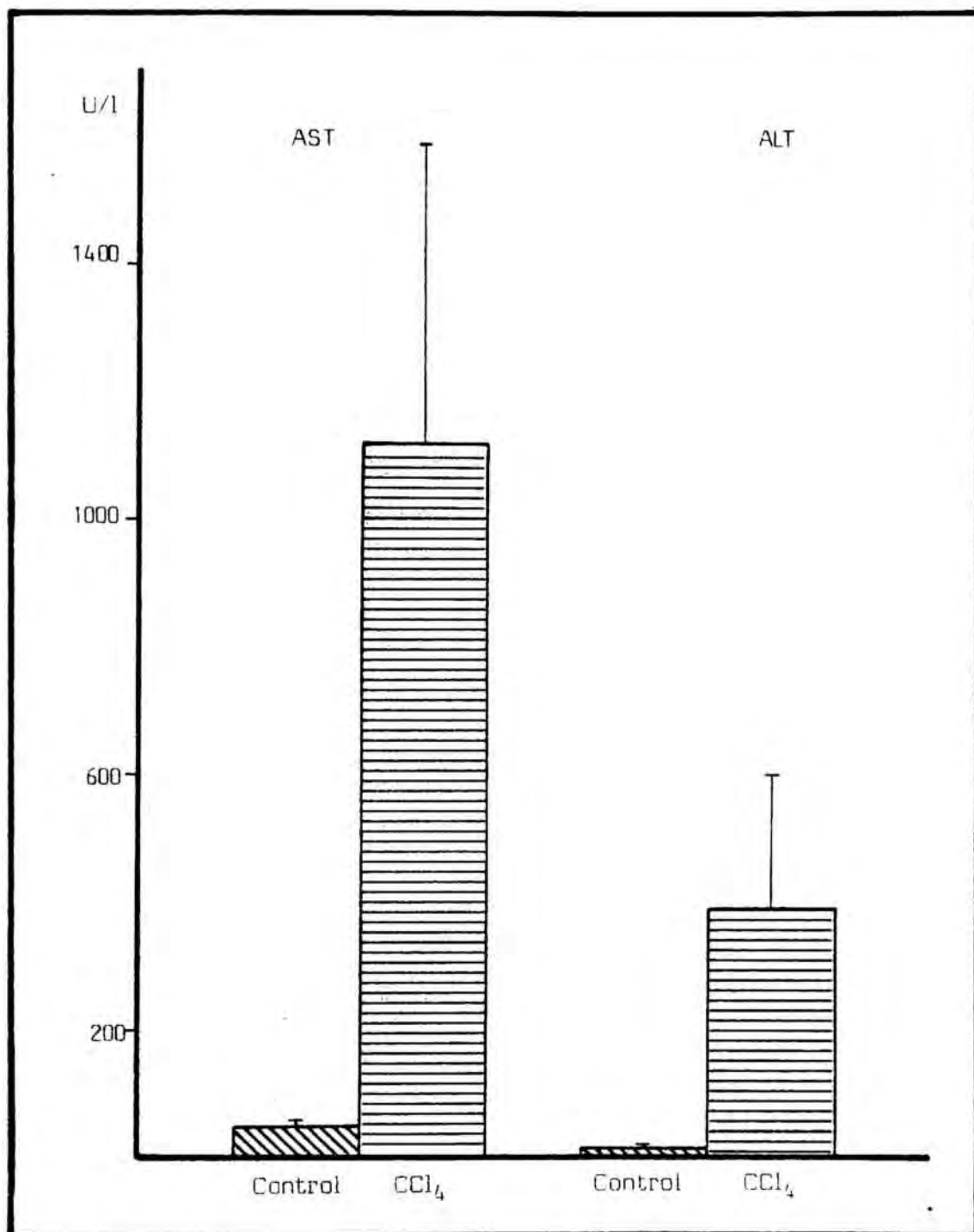


Figura V

la al torrente circulatorio. Esta elevación se traduce a nivel histológico en extensas zonas de necrosis centrolubulillar como ya se indicó al comentar la fotografía II.

Los parámetros K_5 y R_{15} , indicadores del funcionalismo hepático sufren una profunda modificación respecto a los animales control, como se aprecia en la Fig. VI, que representa la evolución de la BSP plasmática a lo largo del tiempo, para los grupos Control e Intoxicado. La disminución de K_5 indicaría un descenso del flujo sanguíneo hepático y, esencialmente, una menor eficiencia en la captación de BSP. Este fenómeno vendría determinado, más que por una alteración en los mecanismos transportadores, por una reducción del número total de hepatocitos.

La interpretación de la modificación sufrida por el parámetro R_{15} (incremento cercano a las 20 unidades) comporta una mayor dificultad. Indiscutiblemente, la brusca reducción de la masa funcional hepática juega un papel importante. De la misma forma, las alteraciones inducidas por el CCl_4 en la membrana plasmática de los hepatocitos contribuyen al aumento detectado. Por una parte, la mayor permeabilidad puede favorecer el reflujo de BSP del citosol celular a la sangre; por otra, los mecanismos excretores biliares pueden verse dañados, favoreciendo un acúmulo excesivo de BSP en el citoplasma celular.

En cualquier caso, un incremento en los valores de R_{15} tan marcado induciría a pensar en un fenómeno colestático que, en principio, no es usual en las intoxicaciones produci-

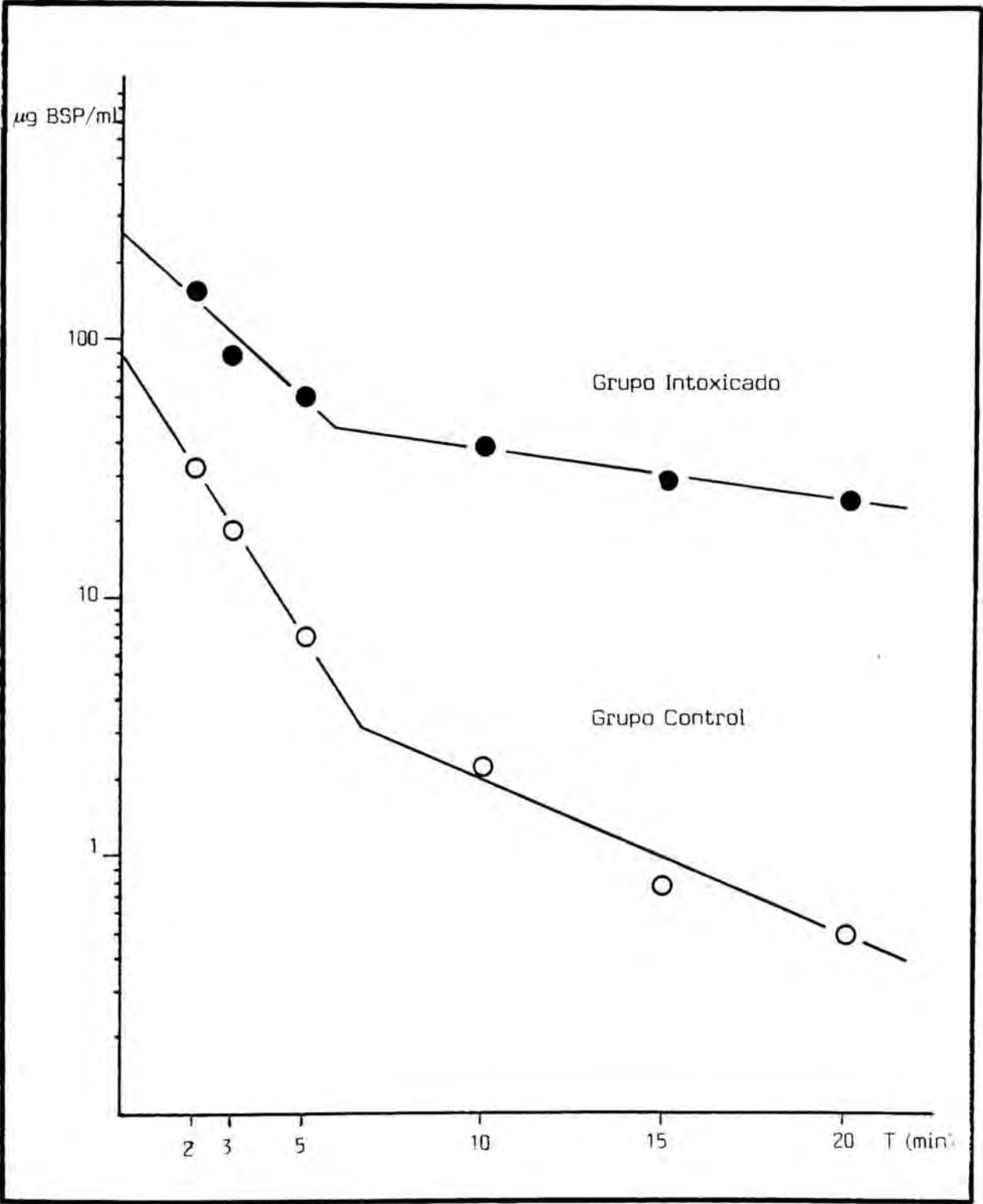


Figura VI

das por hidrocarburos halogenados.

La AP no se ve modificada tras la administración del tóxico, hecho en concordancia con la información bibliográfica existente, en la que se afirma que el CCl_4 no produce fenómenos obstructivos (SCHLAEGER y col. 1982).

El estudio de la hiperbilirrubinemia detectada no permite desechar la hipótesis de una colestasis. El CCl_4 produce en los animales intoxicados un incremento en los niveles de bilirrubina, tanto libre como conjugada (Fig. VII) (esta última no es detectable en el grupo Control). En la alteración de la bilirrubina libre intervendrían tres factores estrechamente interrelacionados:

- . El aumento en el aporte de bilirrubina, debido esencialmente a la destrucción masiva de citocromo P-450 por el tóxico.

- . La saturación de los sistemas metabólicos, producida por la drástica reducción del número de células funcionales.

- . La posible afectación de las glucoroniltransferasas microsomales.

Este último factor no puede ser preponderante, dado que se detectan conjugados en el plasma, lo que indica un funcionalismo, en mayor o menor grado, del sistema.

La presencia de BD en el plasma se debería:

- . A una obstrucción de los conductos biliares.

- . A una alteración del sistema transportador de membrana de la bilirrubina, que imposibilitaría su excreción a

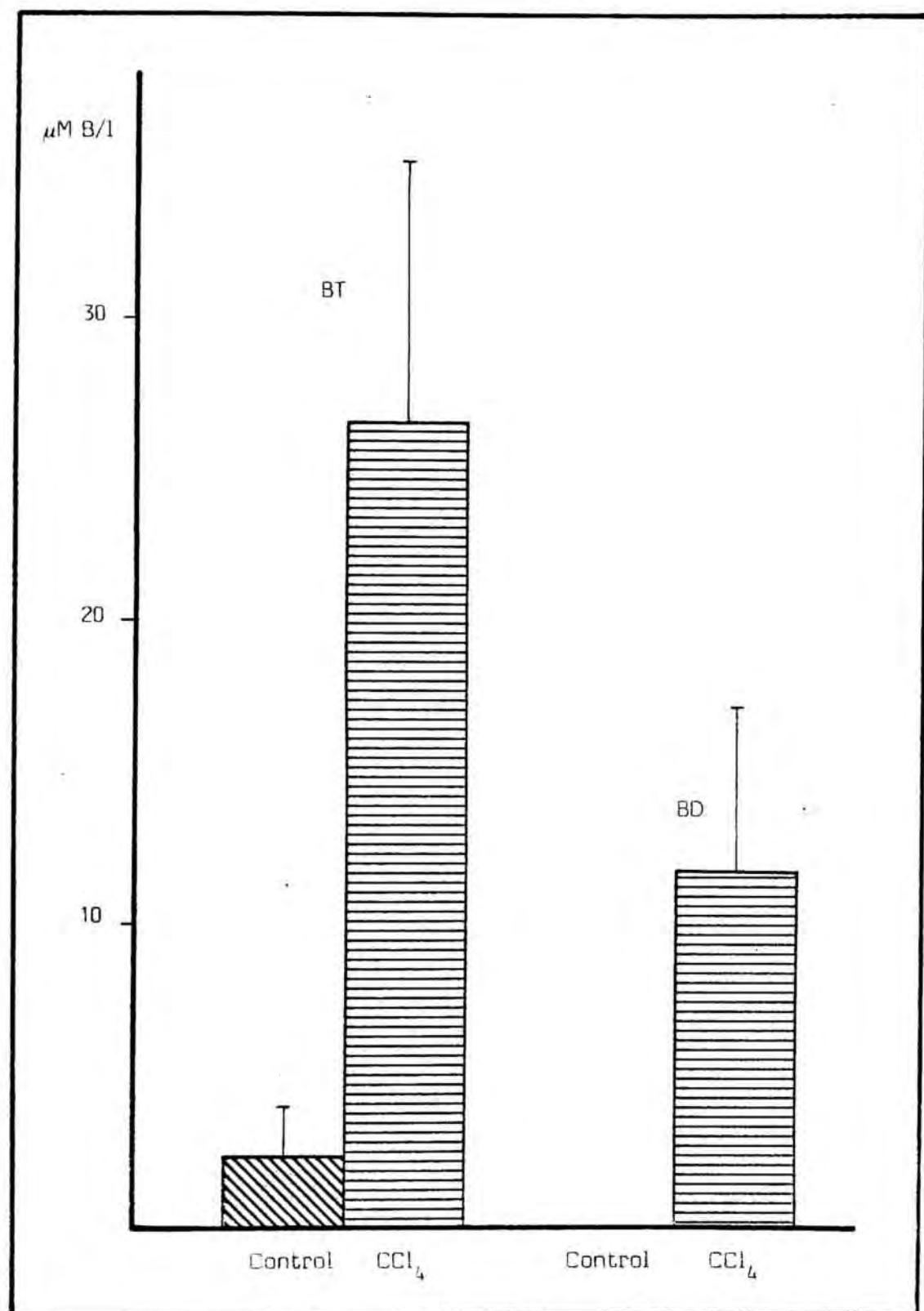


Figura VII

la bilis. Es importante destacar que, tanto para la bilirrubina como para la BSP, interviene el mismo transportador (BLANCKAERT 1983), por lo que su inactivación explicaría conjuntamente el incremento de R_{15} y los niveles de BD detectados. Con esta hipótesis se descartaría la intervención de una colestasis inducida por CCl_4 . Sin embargo, dado que en el estudio histológico se detecta un cierto grado de reacción mesenquimatosa hepática, con infiltración linfocitaria, no se debe descartar la existencia de una ligera retención biliar. Este fenómeno, insuficiente para elevar de forma patológica los niveles de AP, podría intervenir en la modificación de la excreción de BSP y bilirrubina.

La glucemia se ve afectada por la intoxicación, aunque el estudio realizado no permite detectar el mecanismo responsable. Los bajos niveles de glucosa observados podrían deberse, bien a una acción indirecta del CCl_4 sobre los mecanismos de regulación hormonal, bien a una acción directa por destrucción de los sistemas enzimáticos que intervienen en la glucogenolisis hepática.

Los triglicéridos plasmáticos son el único parámetro valorado que presenta una discordancia con el resto de observaciones. El estudio histológico permite apreciar un notable acúmulo de grasa intrahepático, en forma de vacuolas citosólicas, por lo que la elevación detectada en los animales intoxicados no concuerda con la patología típica de la lesión inducida por el CCl_4 .

El estudio de los resultados obtenidos tras la adminis-

tración preventiva del extracto acuoso permite afirmar que no existe ningún signo de recuperación. Por el contrario, se ha de destacar un hecho, la administración de EA a la dosis de 150 mg/Kg altera significativamente el funcionalismo hepático, modificando los parámetros K_5 y R_{15} y los niveles de BD respecto a los animales intoxicados. Paradójicamente este fenómeno sólo es observable a la dosis indicada, mientras que a una dosis superior (500 mg/Kg) no se aprecia ninguna modificación.

Dado que los parámetros indicadores de lesión permanecen inalterados, se ha de suponer la existencia en el extracto de alguna sustancia cuyo metabolismo comporte una agresión adicional para la célula dañada por el CCl_4 . El por qué de la desaparición de este efecto a una dosis superior queda indeterminado.

En cualquier caso, se hace necesario, para proseguir el estudio, la obtención de un extracto más purificado, de forma que se incremente el contenido en derivados cafeilquínicos (prácticamente indetectables en el EA) y se eliminen, al mismo tiempo, sustancias que interfieran en la actividad farmacológica.

Capítulo II. Acción del CCl_4
sobre el metabolismo porfírico.

1.- INTRODUCCION

Durante los estudios precedentes se observó que ciertos plasmas presentaban una intensa coloración. Este fenómeno únicamente se producía en plasmas procedentes de animales in toxicados. Por otra parte, su exposición a la acción de una fuente UV se traducía en una intensa fluorescencia. En conjunto, se pensó en la posibilidad de que se estuviera detectando una porfiria inducida por CCl_4 , por lo que se decidió confirmar esta hipótesis.

En un principio se intentó abordar el problema a la misma dosis de CCl_4 utilizada hasta el momento. Esto no fue posible debido a que, durante las 48 horas de ayuno necesarias para recoger un volumen de orina suficiente para determinar las porfirinas, la gran mayoría de los animales perecía. Por ello, se decidió utilizar una dosis menor de tóxico (CCl_4 al 10% en aceite de oliva) con la que se realizaron todas las experiencias.

Para descartar totalmente la existencia de hemólisis se efectuó, en primer lugar, una valoración de la misma que se describe a continuación.

2.- HEMOLISIS INDUCIDA POR CCl_4

2.1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

20 animales, de 225 ± 20 g. de peso, se dividieron en dos

grupos de estudio:

Grupo Control (10 animales): Dosis de 5 ml/Kg de aceite de oliva, p.o.

Grupo Intoxicado (10 animales): Dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 10% V/V en aceite de oliva.

Los animales permanecieron en ayuno, con agua "ad libitum", durante las 48 horas posteriores a la intoxicación. Al cabo de este período, se extrajo la sangre vía carótida.

Tras la obtención, se valoró inmediatamente el hematocrito. A continuación, se dividió cada muestra en dos partes iguales.

En una alícuota se indujo una hemólisis total, por diluciones sucesivas con agua destilada, valorando:

Hemoglobina (Hb).

Niveles de AST y ALT (capítulo I, apartado 3.3.), únicamente en el grupo control.

La alícuota correspondiente se centrifugó (2000 x g, 5 min), determinándose los niveles de hemoglobina plasmáticos.

2.2.- VALORACION DE LA HEMOGLOBINA

Para la cuantificación de los niveles de Hb se utilizó una técnica policromática (NOE y col. 1984), basada en la determinación de la absorbancia a 3 longitudes de onda diferentes, que permite la eliminación de interferencias debidas a la presencia de triglicéridos y/o bilirrubina en el medio. Concretamente, las lecturas se efectúan a:

380 nm: Máximo de absorción para los triglicéridos.

415 nm: Máximo de absorción de la Hb en medio alcalino.

470 nm: Máximo de absorción correspondiente a la bilirrubina.

Para realizar las lecturas, 0.3 ml de muestra se diluyen en 2.7 ml de tampón Triss (tris(hidroximetil) metilamina) 62.5 mM, pH 8.0 (ajustado con HCl concentrado).

La concentración de Hb viene dada por la fórmula:

$$\text{mg Hb/l} = 1.65 \text{ mA}_{415} - 0.93 \text{ mA}_{380} - 0.73 \text{ mA}_{470}$$

El método es lineal hasta valores de 2000 mg Hb/l. Como blanco se utilizan 0.3 ml de agua destilada diluidos en 2.7 ml de tampón.

2.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos (Tabla X) excluyen la posibilidad de hemólisis. El valor medio de 0.281 g/l de Hb plasmática detectado en los animales intoxicados corresponde a un 0.15% de hemólisis, por lo que ésta se puede considerar, a efectos prácticos, inexistente.

Sí que se produce un incremento significativo de todos los parámetros con respecto al grupo Control. Ahora bien, el hecho de que se vea aumentado el hematocrito hace pensar que el fenómeno es debido a la retención hídrica causada por la

	Control			Intoxicado		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Hematocrito %	8	52	± 2	8	62 ^a	± 5
Hb Total (g/l)	8	164	± 9	10	186 ^a	± 19
Hb plasmática (g/l)	10	0.157	± 0.063	10	0.281 ^a	± 0.157
AST (U/l)	8	449	± 30			
ALT (U/l)	10	79	± 18			
a.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al grupo Control						

Tabla X

inflamación hepática, que conllevaría una concentración de la sangre periférica. De esta manera, las elevaciones observadas serían ficticias, consecuencia indirecta de la pérdida de plasma circulante.

Es necesario hacer hincapié en un dato:

Si se tiene en cuenta que la liberación total de AST y ALT contenidas en los hematíes proporciona unos valores de 449 y 79 U/l, respectivamente, el 0.15% de hemólisis detectado en los animales intoxicados correspondería a una elevación de 0.67 y 0.11 U/l en los niveles de ambas enzimas. Esto implica que la variación de estos parámetros, observada en el estudio anterior, es debida al efecto tóxico del CCl_4 sobre el hígado.

Para corroborar la ausencia de hemólisis en animales in toxicados con CCl_4 al 20% se realizó un estudio idéntico en 10 animales intoxicados a dicha dosis, a las 24 horas postintoxicación. Se obtuvo un valor medio de 0.645 g/l de Hb plasmática, para una Hb total de 192 g/l, lo que representa un 0.33% de hemólisis.

3.- ALTERACION DEL METABOLISMO DE LAS PORFIRINAS POR EL CCl_4

Las porfirinas son compuestos derivados del núcleo de porfina, estructura altamente insaturada integrada por cuatro anillos pirrólicos unidos por puentes metilénicos. Los diferentes tipos de porfirinas se distinguen por el tipo y orden de sustituyentes, siendo de importancia clínica únicamente las uroporfirinas (URO), coproporfirinas (COPRO) y protoporfirinas (PROTO) (GOLDBERG 1971).

En realidad, las porfirinas como tales no desempeñan ningún papel relevante en el funcionalismo celular. Sin embargo, son capaces de quelar al hierro, formando el grupo prostético hemo, integrante de multitud de proteínas esenciales para el mantenimiento de la vida.

La síntesis de las porfirinas se realiza en tres etapas consecutivas, atendiendo a su localización celular (GADJOS 1967) (Fig. VIII):

Formación del ác. Δ -aminolevulínico (Δ -Ala), catalizada por el enzima mitocondrial Δ -Ala sintetasa.

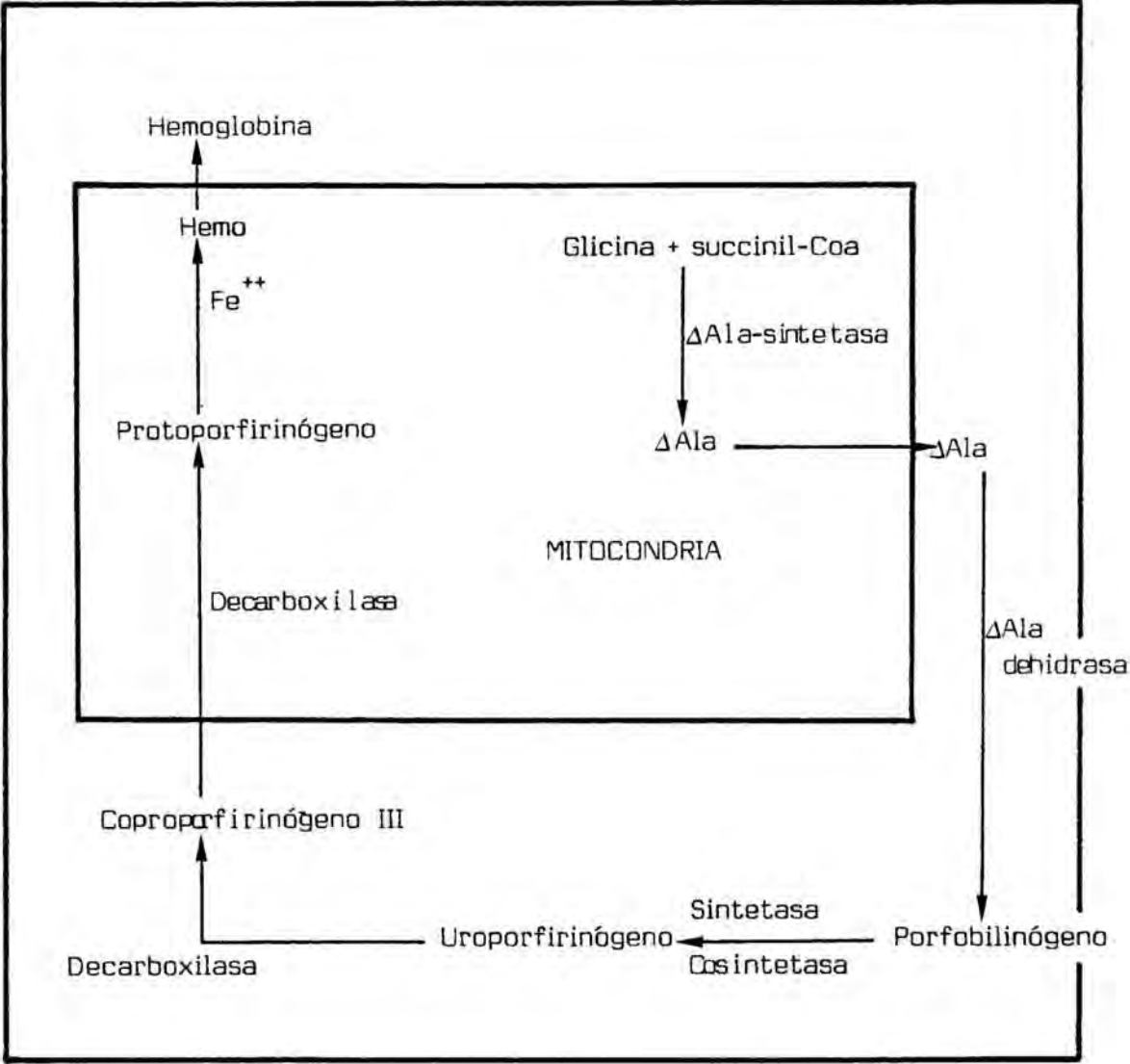


Figura VIII

Obtención del coproporfirinógeno III. Intervienen una serie de enzimas (Δ -Ala-dehidrasa, uroporfirinógeno-sintetasa/cosintetasa y uroporfirinógeno-decarboxilasa) localizados en el citosol celular.

Formación del grupo hemo, por acción de la coproporfirinógeno-decarboxilasa y la hemo-sintetasa mitocondriales.

Como principales factores intervinientes en la homeostasis del sistema se pueden citar (BOUCHERAT y MALLEIN 1977):

El grupo hemo, que presenta un efecto "feed-back" negativo sobre el sistema Δ -Ala sintetasa. Asimismo, actúa como correpresor del operón responsable de la síntesis del enzima.

ATP. La presencia de este nucleótido inhibe la síntesis de Δ -Ala.

Toda esta compleja cadena enzimática está regulada con una gran precisión, de forma que, en condiciones normales, solo se detectan trazas de los productos intermediarios en la síntesis del grupo hemo. La alteración inducida por defectos genéticos o por agentes tóxicos conlleva la excreción patológica de cantidades anormalmente elevadas de precursores (Δ -Ala, URO, COPRO, etc) en diversos fluidos biológicos, fenómeno conocido con el nombre de porfiria.

3.1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para el estudio de la porfiria inducida por CCl_4 se utilizaron 17 animales (240 ± 30 g) divididos en dos grupos de

experimentación:

Grupo Control (6 animales): Dosis de 5 ml/kg de aceite de oliva, p.o.

Grupo Intoxicado (11 animales): Dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 10% en aceite de oliva V/V, p.o.

Una vez intoxicados (16 horas), los animales se instalaron en jaulas de metabolismo (Tecniplast), recogiendo la orina excretada en 48 horas. Durante este período de tiempo permanecieron en ayuno con agua "ad libitum". Para evitar la degradación de las porfirinas, el recipiente colector se protegió de la acción de la luz.

3.2.- EXTRACCION Y VALORACION DE LAS PORFIRINAS URINARIAS

La extracción y separación de los diferentes tipos de porfirinas excretadas en orina se basa en la gradación de solubilidad debida al diferente número de grupos carboxílicos presentes en la molécula. Así, las uroporfirinas, con 8 grupos, son las más solubles en medio acuoso, apareciendo mayoritariamente en la orina. Las protoporfirinas, con dos grupos ácidos, son las más hidrófobas, estando ausentes de la orina. Las coproporfirinas, de solubilidad intermedia, se excretan tanto a nivel urinario como fecal.

En un principio se utilizó un método directo para la cuantificación de porfirinas, basado en la valoración espectrofotométrica de las muestras, diluidas 1/10 en HCl 1 M (TU-

TOR y col. 1983), pero los resultados no fueron satisfactorios. Debido a ello, se aplicó un proceso extractivo (RIMINGTON 1971), que consta de las siguientes etapas (Fig. IX):

Se parte de 25 ml de orina o, en su caso, de 5 ml de orina diluidos con agua destilada a un volumen final de 25 ml.

La muestra se mezcla en un embudo de decantación con 2.5 ml de ác. acético y 50 ml de éter etílico, agitando vigorosamente. Una vez separadas las capas, la fase acuosa se reextrae con otros 50 ml de éter.

Los líquidos etéreos reunidos se limpian por mezcla sucesiva con:

20 ml de solución de acetato sódico (13 g NaAcO/l). El proceso se repite hasta que la fase acuosa no muestra fluorescencia roja. Para evitar pérdidas, la solución acuosa se lava con un volumen idéntico de éter etílico.

El extracto etéreo se trata con 2 x 50 ml de solución de iodo al 0.005%. De esta manera se oxidan las formas porfirogénicas. La solución de iodo es de preparación extemporánea a partir de una solución madre, constituida por:

Iodo sublimado.....	1 g
Etanol absoluto.....	100 ml
Agua destilada c.s.p.	200 ml

Por último, se eliminan los restos de iodo con 3 x 25 ml de agua destilada.

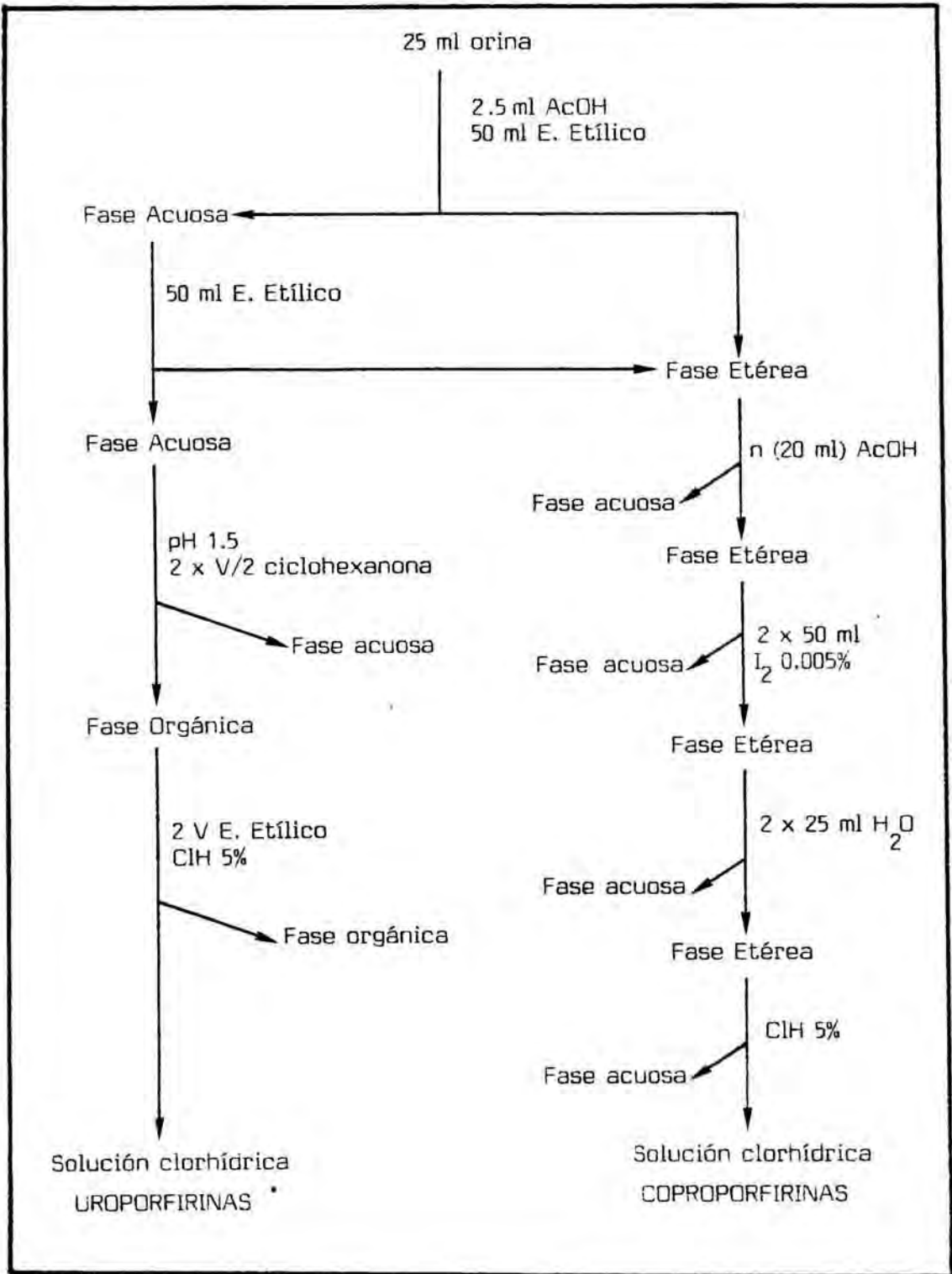


Fig. IX. Extracción de las porfirinas urinarias

Las coproporfirinas se extraen de la fase etérea con fracciones sucesivas de HCl al 5%, hasta que éstas no muestran fluorescencia. Una vez reunidas todas las fracciones y registrado el volumen total, se centrifuga la solución, para eliminar impurezas en suspensión, realizando a continuación la valoración cuantitativa.

Las uroporfirinas se separan de la fase acuosa resultante de la extracción inicial con éter. Para ello, se acidifica con HCl conc. a un pH de 1.5 y se registra el volumen resultante V. La solución se extrae por dos veces con V/2 ml de ciclohexanona.

Reunidos los líquidos extractivos, se añaden 2 V de éter etílico y se obtienen las uroporfirinas con HCl al 5% de forma idéntica a la indicada para las coproporfirinas.

La valoración cuantitativa de las porfirinas se realiza por un método espectrofotométrico, registrando el espectro de absorción de las soluciones clorhídricas en la denominada banda de SORET (380-430 nm) (RIMINGTON 1960), según las ecuaciones:

$$\begin{aligned}\mu\text{g COPRO/l} &= (2A_{\text{max}} - (A_{430} + A_{380})) \times 837 \times \frac{V}{v} \\ \mu\text{g URO/l} &= (2A_{\text{max}} - (A_{430} + A_{380})) \times 832 \times \frac{V}{v}\end{aligned}$$

v = volumen de solución clorhídrica.

V = volumen de orina

En las condiciones descritas, A_{max} = 402 nm para las coproporfirinas y 405 nm para las uroporfirinas.

3.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se muestran en la tabla XI[#], expresados en μg de porfirina excretados durante 48 horas y por 100 g de peso.

	COPRO			URO		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	6	2.32	± 1.71	6	0.22	± 0.12
Intoxicado	11	6.66 ^a	± 3.03	11	0.27	± 0.20
a.- Diferencia significativa para $p < 0.01$						

Tabla XI

Indudablemente, la administración de CCl_4 produce un neto aumento en la excreción urinaria de coproporfirinas (Fig. X), por lo que se podría describir el CCl_4 como tóxico porfirogénico.

El sedormid (N-(2-isopropil pent-4-enoil)urea) desencadena una notable activación de la Δ -Ala sintetasa, aparecien-

El análisis estadístico de los resultados expuestos en las Tablas X y XI se ha realizado por el método de la t de STUDENT para grupos no pareados.

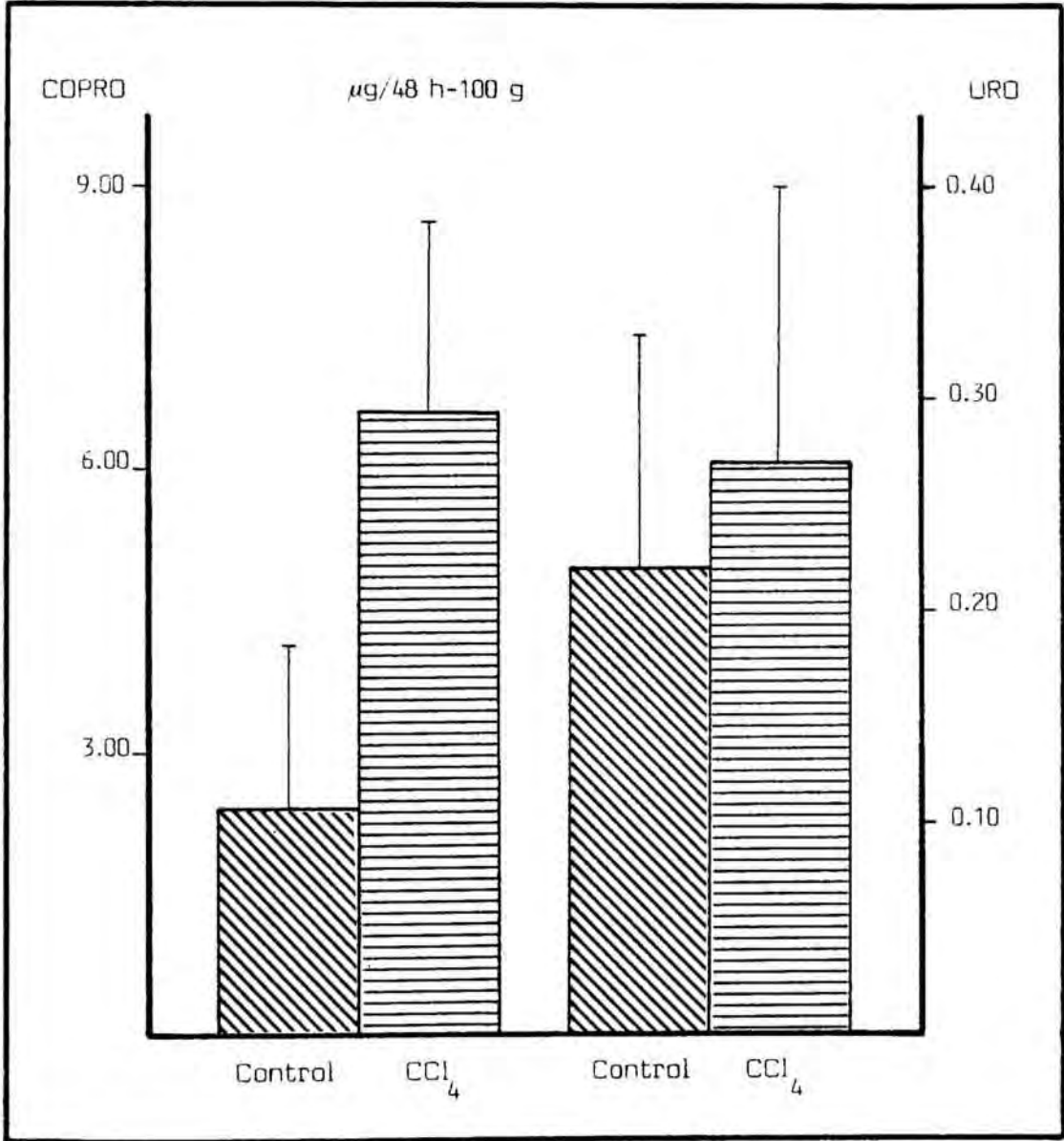


Figura X

do cantidades patológicas de Δ -Ala y porfobilinógeno en la orina de animales tratados con este fármaco. Se ha podido comprobar que, simultáneamente, se produce un desacoplamiento de los mecanismos oxidativos celulares, con disminución en los niveles de ATP. Estos fenómenos son inducidos igualmente por el CCl_4 . Por otra parte, el oxígeno, que inactiva ciertos enzimas de la cadena biosintética de las porfirinas, ve disminuída su tensión en los hígados intoxicados con CCl_4 (De MATTEIS 1967).

Otro dato de interés es el hecho, inexplicable hasta el momento, de que las ratas hembras sean mucho más susceptibles a la acción de agentes porfirogénicos. En este fenómeno parecen estar implicados factores hormonales (la terapia androgénica es efectiva en el tratamiento de porfirias inducidas) y el elevado contenido en hierro del tejido hepático en las hembras (LINDER y col. 1973), dado que se conoce una actividad estimulante de este metal en la síntesis de porfirinas.

Sin embargo, los conocimientos que se poseen hasta el momento sobre el CCl_4 no indican ningún efecto de este tipo. En la bibliografía consultada, el CCl_4 es escasamente nombrado y, siempre, en sentido negativo. Así, GRANIK y URATA (1962) afirman que la hipoxia inducida por una intoxicación aguda con CCl_4 en cobaya no provoca ningún tipo de porfiria; RASHEVSKAYA y EVLASHKO (1973), en un estudio realizado sobre 284 pacientes afectados por diferentes tóxicos, no encuentran alteración alguna en el metabolismo porfírico de aquellos sujetos intoxicados con CCl_4 . Únicamente BRENMER (1974) apre-

cia fenómenos de fotosensibilización, asociados a sustancias de naturaleza porfírica, en cobayas intoxicados con CCl_4 , pero de forma crónica.

El hexaclorobenceno y otros derivados halogenados inducen un incremento en la síntesis de porfirinas, con acúmulo de uro y coproporfirinas. Ahora bien, las características de la patología inducida es completamente diferente a la observada en este caso:

Precisan administración repetida.

Inducen un incremento en los niveles de citocromo P_{448} hepático, cuando el CCl_4 destruye estas macromoléculas.

Producen síntomas neurológicos, abdominales, fotosensibilización, etc., ausentes en los animales estudiados.

El paso de coproporfirina a protoporfirina es la única etapa de la biosíntesis de las porfirinas que precisa la intervención de procesos oxidativos, realizados por enzimas mitocondriales. Por otra parte, el CCl_4 modifica profundamente, no solo la tensión de oxígeno hepática, sino la fosforilación oxidativa mitocondrial (SMUCKLER 1984), alterando todos los mecanismos redox celulares. Estos datos podrían explicar el fenómeno detectado: El CCl_4 no es una sustancia específicamente porfirogénica, ya que no incrementaría la síntesis de porfirinas. El aumento en la excreción de coproporfirinas se debería al bloqueo del paso biosintético anteriormente descrito. Debido a la alteración de la permeabilidad de membrana producida por el tóxico, las coproporfirinas acumuladas exudarían al plasma y, de esta forma, verían incrementada su tasa de excreción urinaria.

Capítulo III.

Acción Farmacológica de
un extracto metanólico
de Cynara scolymus L.

Salvo indicación expresa, las condiciones de trabajo, así como los métodos utilizados, son idénticos a los descritos en el Capítulo I.

1.- OBTENCION DEL EXTRACTO METANOLICO. ANALISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO

Una vez preparado el EA, según se indicó anteriormente, el residuo seco resultante se redisuelve en 30 ml de agua destilada. A continuación, se añaden 300 ml de metanol absoluto, con lo que se consigue la precipitación de sustancias de naturaleza muy polar (polisacáridos, proteínas, etc). La suspensión resultante se filtra al vacío y el marco se redisuelve en 30 ml de agua destilada, repitiendo el proceso por dos veces.

Los líquidos hidrometanólicos reunidos se llevan a extracto seco y, redisueltos en la mínima cantidad de agua, se liofilizan para su conservación (Fig. XI).

El rendimiento de la extracción es del 15-17%. Para el análisis cuali y cuantitativo de los compuestos polifenólicos del extracto se ha utilizado la cromatografía líquida de alta resolución, aplicando la técnica de análisis descrita por ADZET y PUIGMACIA (1985).

Los análisis se han realizado en un cromatógrafo Perkin Elmer, Series 2, dotado con detector espectrofotométrico LC-85 y Sigma-15 Data Station. Los reactivos empleados han sido de calidad cromatográfica (Carlo Erba, Merck). Los pa-

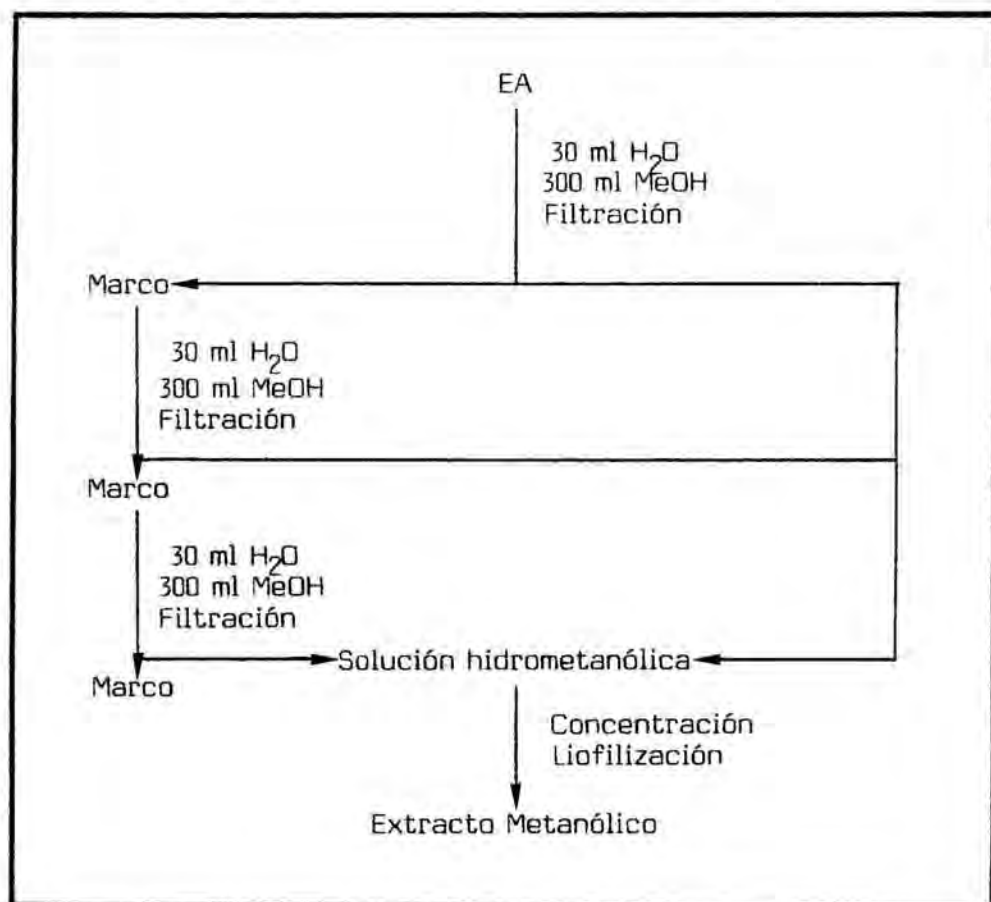


Fig. XI. Obtención del extracto metanólico

trones de derivados cafeilquínicos empleados en la calibración del método se han conseguido de las casas Sigma, Fluka y Sarsyntex, o bien han sido aislados en el laboratorio.

La composición en compuestos polifenólicos del extracto metanólico (% referido al EM) es la siguiente:

Ac. Neoclorogénico.....	0.359%
Ac. Criptoclorogénico.....	0.506%

Ac. Clorogénico.....	0.564%
Ac. Cafeico.....	0.046%
Ac. 1,5-dicafeilquínico.....	0.082%
Ac. 1,3-dicafeilquínico.....	0.520%
Ac. 3,4-dicafeilquínico.....	0.037%
Ac. 3,5-dicafeilquínico.....	0.055%
Ac. 4,5-dicafeilquínico.....	0.051%
7-glucosil luteolina.....	0.921%
Polifenoles totales.....	3.141%

2.- INFLUENCIA DEL EXTRACTO METANOLICO SOBRE EL "CLEARANCE" DE BSP EN ANIMALES INTOXICADOS POR CCl_4

A fin de descartar la existencia de un fenómeno similar al descrito para el EA, se realizó en primer lugar un estudio sobre el "clearance" de la BSP. Para corroborar los resultados obtenidos se determinó conjuntamente la excreción biliar de BSP.

2.1- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se dispuso de 17 animales (230 ± 20 g) distribuidos en 3 grupos de estudio:

Grupo Control (4 animales): Dosis de 5 ml/kg de aceite de oliva p.o.

Grupo Intoxicado (4 animales): Dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 20% en aceite de oliva V/V, p.o.

Grupo Tratado (9 animales): Dosis de 200 mg EM/Kg, p.o., administrado 1 hora antes de la intoxicación por CCl_4 .

Los grupos Control, Intoxicado y 4 animales del grupo Tratado se utilizaron para la valoración de la excreción biliar de BSP. Los 5 animales restantes del grupo problema sirvieron para la determinación del "clearance" plasmático de la BSP. En ambos casos se efectuó el estudio a las 24 horas postintoxicación. El CCl_4 se administró a las 16.00 horas.

2.2.- VALORACION DE LA EXCRECION BILIAR DE BSP

Al animal anestesiado se le realiza una laparatomía media, incidiendo los planos musculares por la línea alba y descubriendo la cavidad abdominal. Visualizado el hígado se separan los lóbulos hepáticos, debajo de los cuales se puede observar, rodeado de tejido adiposo, el conducto colédoco. Al separar éste de los elementos que lo acompañan se le practica una incisión en la zona más próxima a su entrada al duodeno. Se introduce una cánula de material plástico (0.25 mm ϕ), se fija mediante ligaduras, recogiendo la bilis excretada durante 5 minutos. Esta fracción se utilizará como blanco.

A continuación, se administra BSP por la vena femoral a una dosis de 4 mg/Kg, recogiendo la bilis excretada a intervalos de 5 minutos durante un período de 40 minutos (BOUCARD y ABELA 1963).

La concentración de BSP excretada se determinó por valoración colorimétrica a 575 nm, previa alcalinización de las

muestras con 1 ml de NaOH 0.1 N.

Para el estudio comparativo se utilizó el porcentaje de BSP excretado por vía biliar.

2.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla XII se representan los resultados individuales del grupo Tratado. La comparación de los valores de K_5 y R_{15} con respecto a los grupos Control e Intoxicado se muestra en la tabla XIII.

T	$\mu\text{g BSP/ml}$				
2	104.7	90.3	71.4	54.1	39.7
3	79.0	65.4	34.0	33.7	19.8
5	43.8	39.0	16.0	15.3	7.2
10	31.9	20.3	8.2	5.1	3.0
15	20.5	13.2	5.2	4.0	2.3
20	16.2	11.5	3.7	1.6	0.9
K_5	0.291	0.276	0.481	0.417	0.560
R_{15}	11.673	9.435	3.209	2.267	1.562

Tabla XII

Como se aprecia en la figura XII, el tratamiento preventivo con una dosis de 200 mg/Kg de EM (equivalente a 6.3 mg de compuestos polifenólicos/Kg) mejora sensiblemente el funcionalismo hepático global, normalizando los valores de K_5 y

	K_5			R_{15}		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	5	0.501	± 0.108	5	1.285	± 1.205
Intoxicado	5	0.200	± 0.056	5	19.454	± 11.234
Tratado	5	0.405 ^a	± 0.122	5	5.701 ^a	± 4.538
a.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al grupo Intoxicado						

Tabla XIII

R_{15} . Este primer parámetro no se diferencia significativamente del encontrado para el grupo Control, lo que implica que el flujo sanguíneo y la captación de BSP por parte de los hepatocitos se encuentran restablecidos.

Los valores de excreción biliar de BSP corroboran estos resultados. La tabla XIV presenta el % de excreción de BSP a cada intervalo de tiempo, así como el % de excreción acumulado en el transcurso de los 40 minutos de la experiencia.

La administración del EM produce un incremento global en la excreción de BSP en comparación con los animales intoxicados (Fig. XIII). Asimismo, el máximo de aparición de la BSP en la bilis se produce a los 10 minutos de la administración del extracto, al igual que en los animales control, mientras que en el grupo Intoxicado la eliminación de BSP se ve impedida, produciéndose el máximo a los 15 minutos (Fig. XIV).

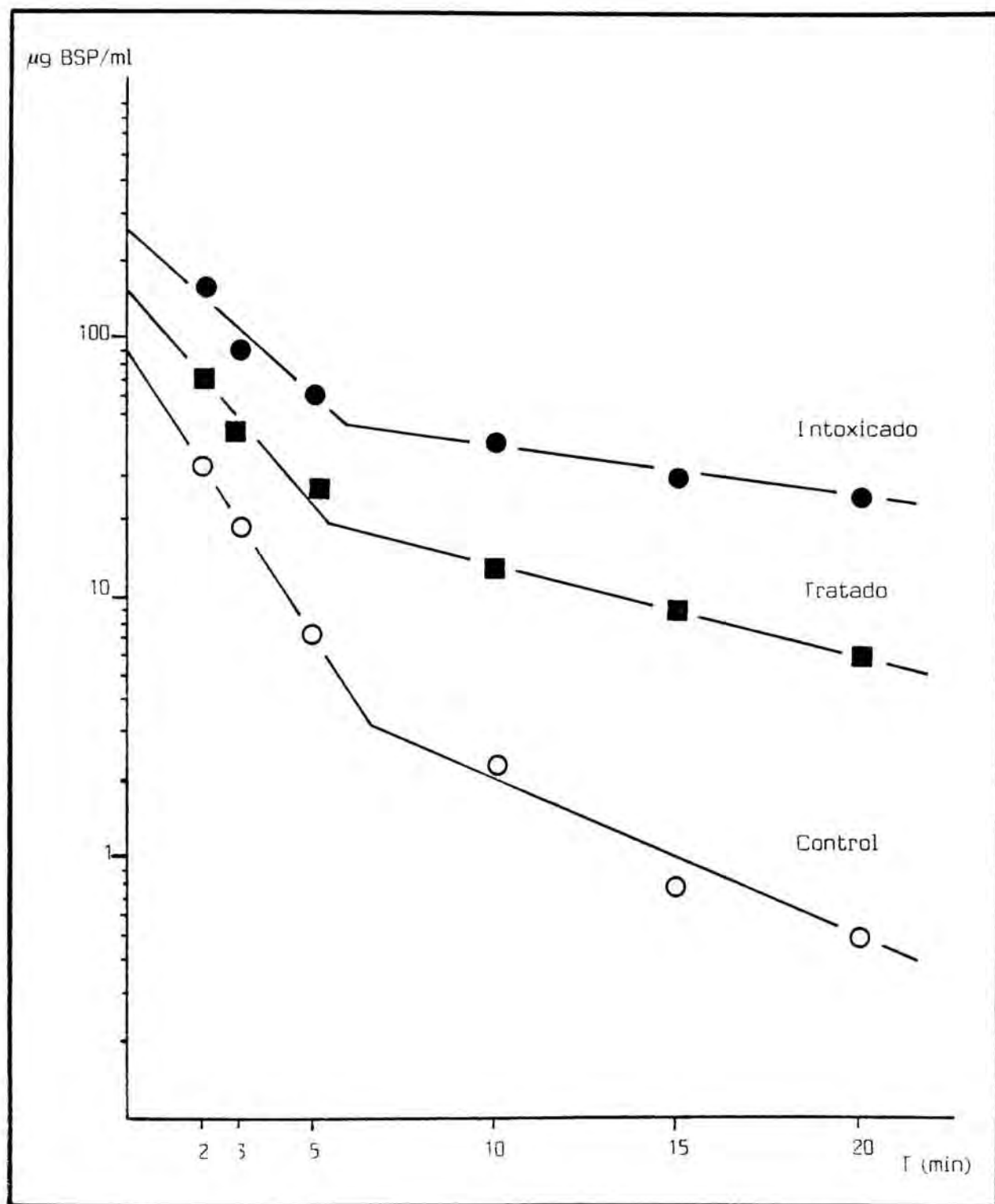
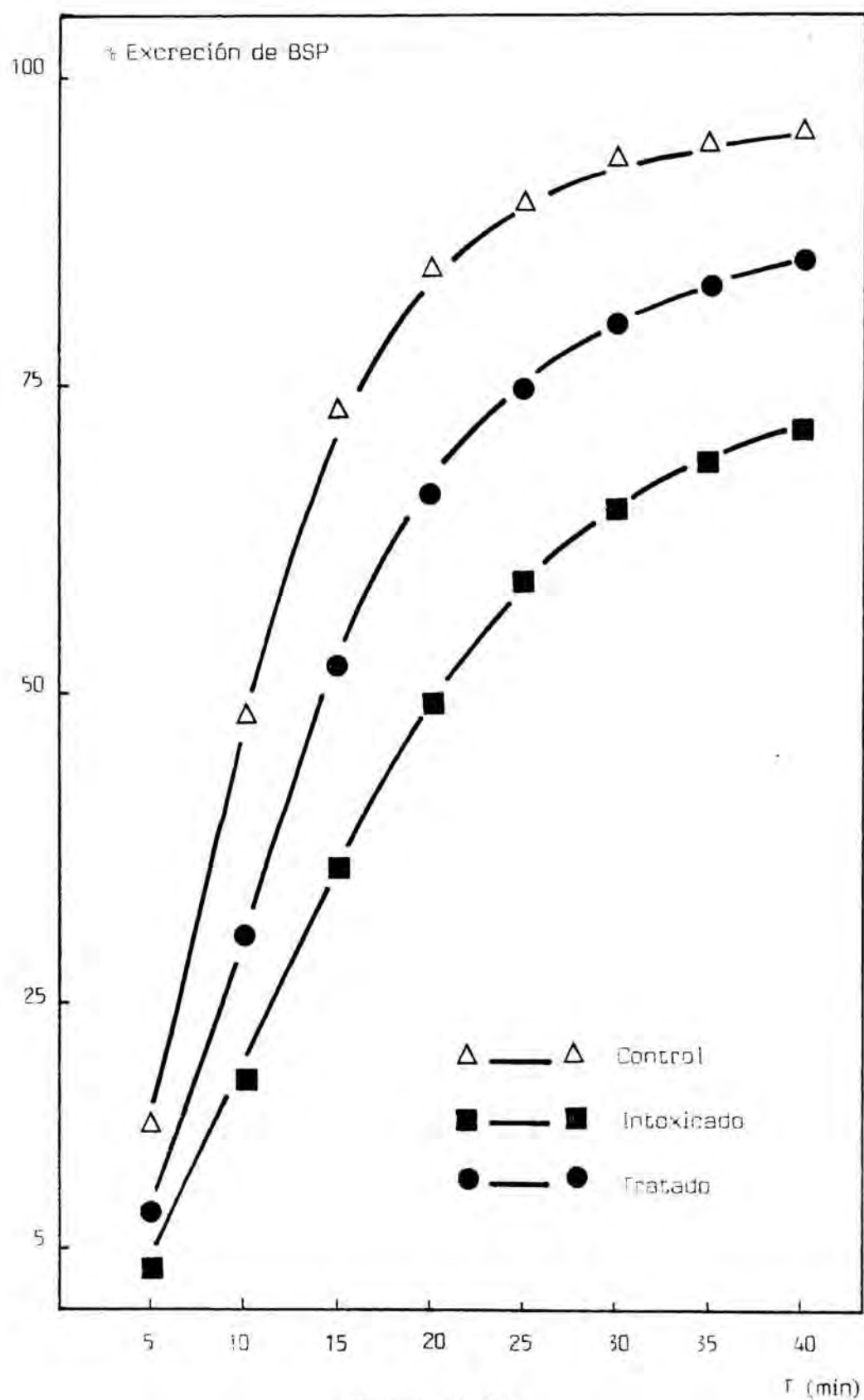


Figura XII



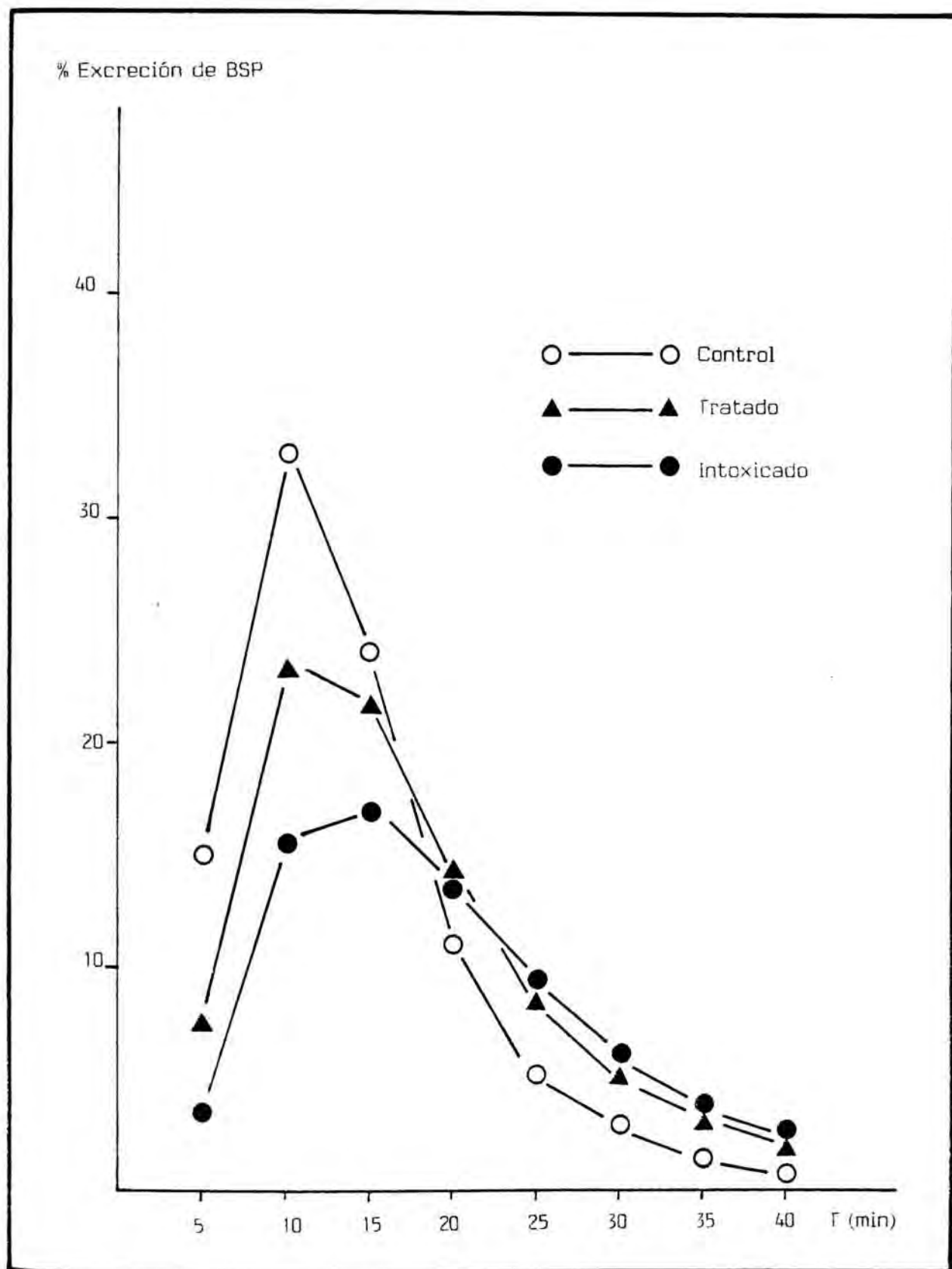


Figura XIV

T	Control	Intoxicado	Tratado
5	15.08 \pm 2.89	3.60 \pm 0.48 ^a	7.37 \pm 2.84 ^b
10	33.49 \pm 2.32	15.44 \pm 2.37 ^a	23.32 \pm 4.98 ^b
15	24.78 \pm 2.76	17.06 \pm 2.57 ^a	21.72 \pm 0.88 ^b
20	11.35 \pm 1.34	13.66 \pm 2.37	13.76 \pm 1.51
25	5.26 \pm 0.87	9.43 \pm 0.61 ^a	8.53 \pm 1.53
30	3.43 \pm 2.27	6.03 \pm 0.65 ^a	5.02 \pm 1.53
35	1.38 \pm 0.41	3.52 \pm 0.67 ^a	3.29 \pm 0.67
40	0.74 \pm 0.26	2.37 \pm 0.41 ^a	2.17 \pm 0.58
% Total	95.52 \pm 3.02	71.17 \pm 7.04 ^a	85.48 \pm 3.28 ^b

a.- Diferencia significativa para $p < 0.05$ respecto al grupo Control.

b.- Diferencia significativa para $p < 0.05$ respecto al grupo Intoxicado.

Tabla XIV

Es de destacar que la acción restauradora del extracto únicamente se manifiesta en los 15 primeros minutos de la experiencia. A partir de este momento, el comportamiento es idéntico al de los animales intoxicados. Esta fase coincide, aproximadamente, con el intervalo de tiempo utilizado para la valoración del "clearance" de la BSP.

3.- DETERMINACION DE PARAMETROS SANGUINEOS. CCl_4 AL 20%/24 HORAS POSTINTOXICACION

Dado que el EM favorecía la recuperación del funcionamiento hepático, era preciso verificar que la lesión celular producida por el CCl_4 también se veía disminuida. Para ello, se

realizó el siguiente estudio:

3.1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Se repartieron 40 animales (240 ± 20 g) en 4 grupos:

Grupo Control (10 animales): Dosis de 5 ml/Kg de aceite de oliva, p.o.

Grupo Intoxicado (10 animales): Dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 20% V/V en aceite de oliva, p.o.

Grupo de Referencia (10 animales): Dosis de 700 mg/Kg de silimarina (Roth), p.o., una hora antes de la administración del tóxico.

Grupo Tratado (10 animales): Dosis de 200 mg/Kg de EM p.o., una hora antes de la intoxicación.

Se hizo necesario verificar que el diseño experimental utilizado en la valoración farmacológica de los extractos de Cynara scolymus L. permitía evidenciar una actividad hepatoprotectora. Por esta razón, se introdujo el tratamiento con silimarina. Esta sustancia, aislada e identificada por WAGNER (1974), es una mezcla de varios isómeros (mayoritariamente silibina, silicristina y silidianina) extraída de las semillas del cardo mariano (Silybum marianum L. Gaertn). En pruebas realizadas en animales de experimentación muestra una marcada acción, tanto preventiva como curativa, frente a diversos tóxicos hepáticos: D-galactosamina (TYNTYULKOVA y col. 1981), faloidina (VOGEL y col. 1974), praseodimio (TUCHWEBER y col. 1976), etanol (PLATT y SCHNORR 1971) y, específicamente, sobre

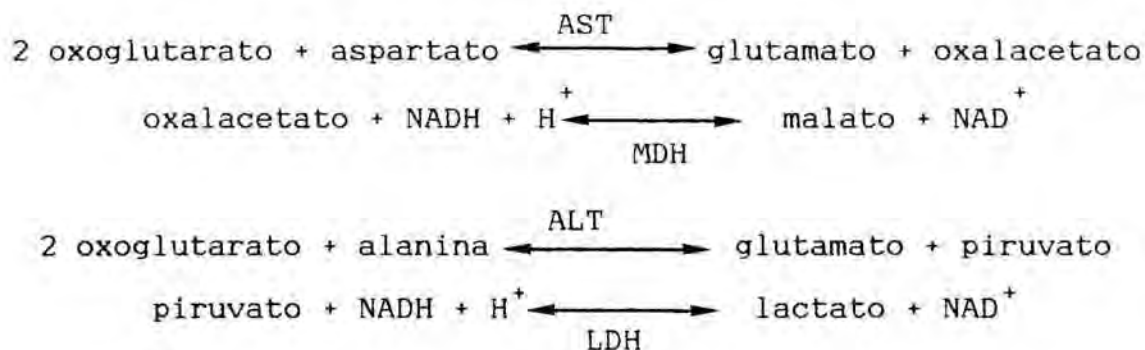
la lesión inducida por CCl_4 (RAUEN y SCHRIEWER 1971, RAUEN y col. 1973).

La administración del tóxico se efectuó a las 16.00 horas. Al cabo de 24 horas se determinaron los siguientes parámetros plasmáticos:

3.2.- PARAMETROS DETERMINADOS

AST y ALT

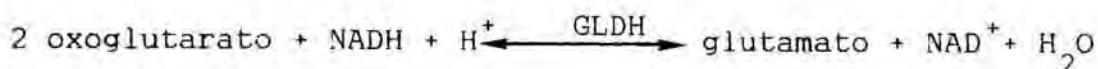
Debido a la excesiva duración del método colorimétrico empleado en los estudios previos, en este caso se utilizó un test UV optimizado (Merkotest), basado en las reacciones:



La desaparición de NADH del medio de reacción, proporcional a la actividad enzimática, se cuantifica a 340 nm, a 37 °C.

Glutámico deshidrogenasa GLDH (E.C. 1.4.1.3.) (Boehringer Mannheim)

Se introdujo su valoración a fin de disponer de un parámetro que reflejara exclusivamente el daño mitocondrial. La cuantificación de la actividad enzimática se basa también en la desaparición del NADH, según la reacción:



realizando las determinaciones a 340 nm y 25 °C.

BT y BD

Colesterol COL. Método enzimático CHOD-Ioduro (Merck)

Se decidió su cuantificación como posible medio diferenciador de colestasis. Mediante la acción de detergentes, se liberan el colesterol y sus ésteres de las lipoproteínas plasmáticas. Una vez hidrolizados los ésteres por acción de la colesteroles-esterasa, la oxidación producida por la colesteroles oxidasa da lugar a la formación de H_2O_2 . Esta transforma el ioduro en iodo, que se cuantifica a 405 nm.

No se determinaron los niveles de glucosa y triglicéridos plasmáticos, debido a su escaso valor diagnóstico.

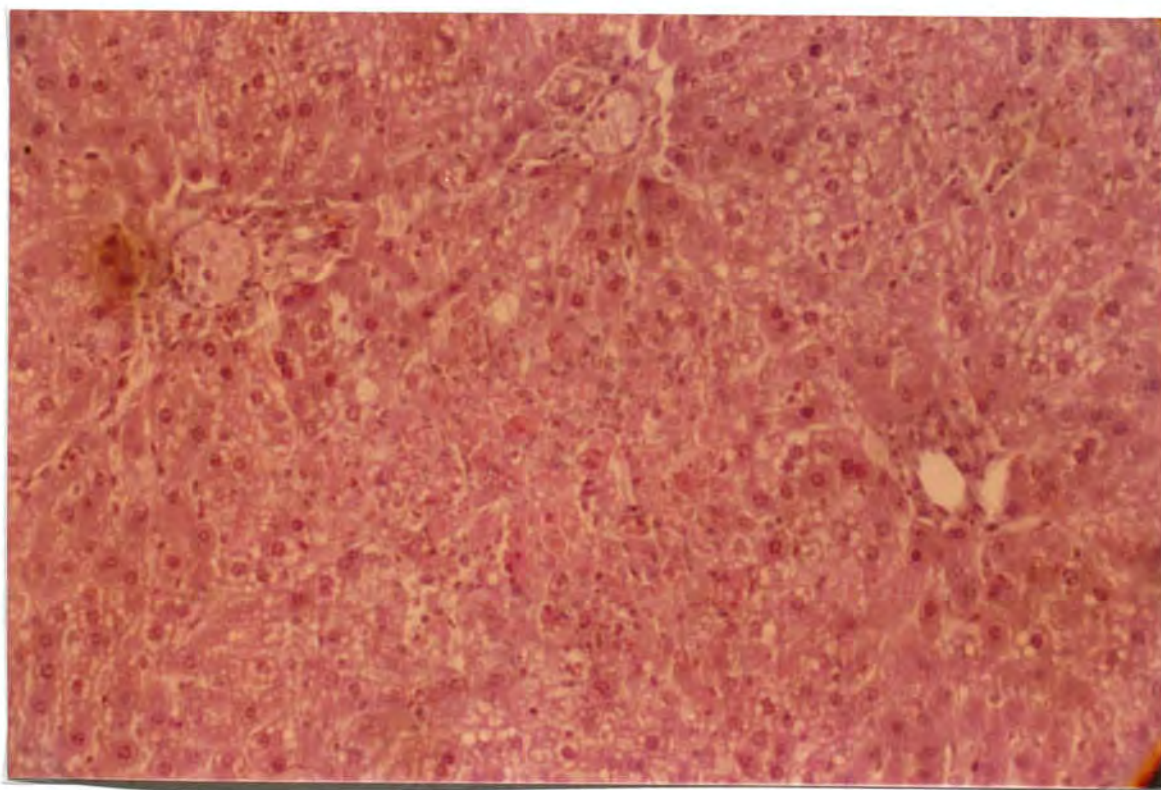
Únicamente se determinaron en el grupo Control aquellos parámetros cuyo método de valoración hubiera sufrido modificación, o bien aquellos introducidos por primera vez en el estudio.

Al mismo tiempo, se tomaron muestras de tejido hepático para su observación histológica.

3.3.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el estudio de los parámetros plasmáticos se muestran en la tabla XV, indicando la media y los límites del error standard de la misma ($p < 0.05$). En el caso de la BD, aparece el porcentaje de plasmas que presentaron valores detectables.

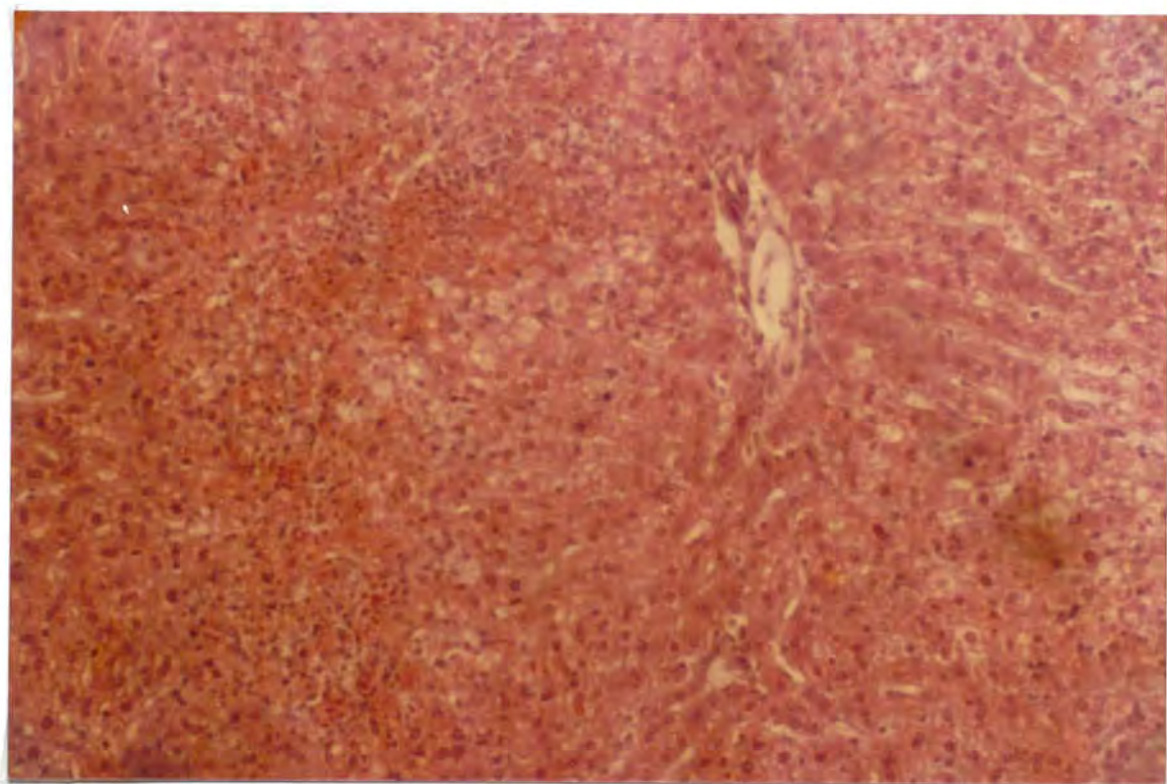
Las fotografías V y VI corresponden, respectivamente, a preparaciones obtenidas de animales pertenecientes a los gru-



Fotografía V

Control			Intoxicado			Referencia			Tratado		
n	\bar{x}		n	\bar{x}		n	\bar{x}		n	\bar{x}	
AST (U/l)	9	48 (34- 67)	9	2206 (1753- 2778)	^a	9	1578 (1022- 2245)	^f	9	2927 (1880- 4558)	^d
ALT (U/l)	9	17 (15- 19)	9	541 (306- 957)	^a	9	305 (147- 631)	^d	9	762 (424- 1372)	^f
GLDH (U/l)	8	10 (9- 13)	9	120 (76- 209)	^a	9	130 (92- 182)	^c	9	212 (112- 403)	^f
BT (μ M/l)	9	2.41 (1.47- 3.96)	9	37.34 (25.73-54.17)	^a	9	20.23 (9.50-43.08)	^f	8	41.23 (31.65-53.72)	
BD (μ M/l)	10	0% ---	9	100% 13.48		9	88% 5.83		9	44% 10.12	
COL* (mM/l)	10	0.65 (0.56- 0.76)	8	0.67 (0.51- 0.89)		8	0.66 (0.40- 1.08)		9	0.76 (0.46- 1.26)	
<p>a.- Diferencia significativa para p<0.01 respecto al grupo Control . c.- Diferencia no significativa respecto al grupo Intoxicado d.- Diferencia significativa para p<0.05 respecto al grupo Intoxicado f.- Diferencia significativa para p<0.01 respecto al grupo Intoxicado * No existe diferencia significativa entre ninguno de los grupos</p>											

Tabla XV



Fotografía VI

pos de Referencia y Tratado, observadas a 100 aumentos. En ambos casos, se aprecia la existencia de necrosis tisular y de pósitos grasos distribuidos por todo el parénquima.

3.4.- DISCUSION

El tratamiento preventivo con silimarina (700 mg/Kg, p.o.) presenta un marcado efecto protector frente a la intoxicación por CCl_4 . Este efecto se manifiesta tanto en una disminución de la lesión (descenso en los niveles de AST y ALT), co

mo en una mejora del funcionalismo hepático (reducción en las tasas de BT y BD). Sin embargo, existen dos parámetros que no se modifican:

La GLDH permanece inalterada con respecto al grupo In toxicado, lo que indicaría que la protección inducida por la silimarina no alcanza plenamente las estructuras mitocondriales.

El estudio histológico (fotografía V) no permite apre ciar ninguna diferencia entre muestras procedentes de animales intoxicados o tratados previamente con silimarina.

En cualquier caso, se ha de tener en cuenta en la interpretación de estos resultados que se administra una dosis muy elevada de tóxico.

La administración del EM produce un efecto paradójico:

El estudio del "clearance" de la BSP, así como la disminución de BD (únicamente presentaron niveles detectables el 44% de los plasmas valorados) indica que los sistemas metabóli cos del hepatocito se ven parcialmente preservados de la acción tóxica del CCl_4 . Por el contrario, los niveles de AST y GLDH sufren un incremento significativo. Dado que la ALT, enzima citosólico, no se ve alterada, estos datos significarían una mayor afectación mitocondrial en los animales tratados con EM.

En función de la baja dosis de compuestos polifenólicos administrada (6.5 mg/Kg) este comportamiento dual se podría explicar de la siguiente forma:

Aquellos hepatocitos que interaccionaran con los deriva-

dos polifenólicos (probablemente en la zona perilobulillar) se verían preservados de la acción del tóxico. El CCl_4 reaccionaría masivamente con el resto de hepatocitos, incrementándose los signos externos de lesión. Dado que las mitocondrias parecen más sensibles al CCl_4 (la silimarina es incapaz de disminuir los niveles de GLDH), esto explicaría el incremento observado en las tasas de AST y GLDH, mientras que, en consecuencia, la ALT permanecería invariable.

En conjunto, parece lógico suponer que sería posible obtener un efecto hepatoprotector agrupando dos factores:

Una disminución en la dosis de CCl_4 , de forma que la lesión producida fuera de menor gravedad.

Un incremento en la cantidad de polifenoles administrada, a fin de conseguir que un gran número de hepatocitos se viera protegido.

La introducción de estas dos modificaciones será el siguiente paso en la prosecución de este estudio.

Finalmente, es necesario advertir de dos consecuencias que se derivan de los resultados obtenidos:

Los métodos histológicos utilizados no presentan suficiente sensibilidad diagnóstica. Permiten diferenciar entre la existencia o no de lesión, pero no delimitan grados de la misma, ya que a nivel histológico es imposible apreciar la mejora producida por la silimarina, o bien, el incremento en la severidad de la lesión observado con el EM (fotografía VI). Por tanto, es innecesaria su utilización posterior.

El colesterol se muestra totalmente ineficaz como

test de diagnóstico, puesto que no sufre modificación en ninguno de los grupos estudiados. Unicamente, la ausencia de un incremento en los animales intoxicados confirma el hecho de que el CCl_4 no produce obstrucción de las vías biliares.

4.- DETERMINACION DE PARAMETROS SANGUINEOS. CCl_4 AL 10%/24 HORAS POSTINTOXICACION

4.1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

El estudio se realizó en condiciones idénticas a las ya descritas, salvo la utilización de una dosis menor de CCl_4 . Se dispuso de 30 animales (240 ± 20 g), divididos en tres grupos:

Grupo Intoxicado (10 animales): Dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 10% V/V en aceite de oliva, p.o.

Grupo de Referencia (10 animales): Dosis de 700 mg/Kg de silimarina, p.o., una hora antes de la administración del tóxico.

Grupo Tratado (10 animales): Dosis de 200 mg/Kg de EM, p.o., una hora antes de la intoxicación por CCl_4 .

A las 24 horas de la intoxicación se determinaron los niveles plasmáticos de AST, ALT, GLDH, BT y BD. Como valores control se utilizaron los mismos que en el estudio anterior.

4.2.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se expresan en la tabla XVI. La utilización de una dosis menor de CCl_4 permite apreciar de forma más patente el efecto hepatoprotector de la silimarina. Así, mientras que en la intoxicación con CCl_4 al 20%, la silimarina no disminuía los niveles de GLDH, en esta ocasión se ven parcialmente revertidos, indicando una menor afectación mitocondrial (Fig. XV). En conjunto, todos los parámetros experimentan una reducción de, aproximadamente, un 50% respecto a los observados en el grupo Intoxicado.

La administración del EM no produce ningún signo de hepatoprotección, si se excluye el descenso en la tasa de BD plasmática. Sin embargo, desaparecen los niveles elevados de AST y GLDH observados en el estudio anterior y, por el contrario, todos los parámetros valorados sufren una disminución con respecto a los animales intoxicados, aunque no significativa.

En el apartado 3.4. de este capítulo se indicaron dos factores cuya introducción podría permitir la observación de un efecto hepatoprotector. El primero, la disminución en la dosis de CCl_4 se ha conseguido al administrar una solución de tóxico al 10%, proporcionando resultados positivos (mejora en la actuación de la silimarina y eliminación de la liberación enzimática observada tras el tratamiento con el EM).

Para realizar el segundo factor, el incremento en la dosis de sustancias polifenólicas, y evidenciar la posible acción hepatoprotectora del extracto, se introdujeron las siguientes modificaciones:

	Control			Intoxicado			Referencia			Tratado		
	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n	\bar{x}
AST (U/l)	9	48 (34- 67)	7	1505 (582- 3896) ^a	10	710 (326- 1545) ^c	10	1282 (520- 3158) ^d				
ALT (U/l)	9	17 (15- 19)	7	284 (147- 547) ^a	9	146 (57- 371) ^c	9	207 (87- 489) ^d				
GLDH (U/l)	8	10 (9- 13)	7	145 (60- 351) ^a	10	86 (44- 167) ^c	10	101 (54- 188) ^d				
BT (μ M/l)	9	2.41 (1.47- 3.96)	7	16.33 (7.27-36.65) ^a	9	6.13 (2.39-15.66) ^b	10	14.85 (5.76-38.29) ^d				
BD (μ M/l)	10	0% ---	7	100%	9	33%	10	60%				4.83%

a.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ con respecto al grupo Control

b.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ con respecto al grupo Intoxicado

c.- Diferencia significativa para $p < 0.05$ con respecto al grupo Intoxicado

d.- Diferencia no significativa con respecto al grupo Intoxicado

Tabla XVI

Dosis de extracto, aumentada a 500 mg/Kg, lo que representa 16.25 mg/Kg en derivados polifenólicos. Asimismo, se administró de forma repetida en el tiempo, con el fin de conseguir un acúmulo en la cantidad de polifenoles presentes en el momento de la intoxicación.

El diagnóstico de la lesión hepática se efectuó a las 48 horas postintoxicación, a fin de disminuir la variabilidad observada en los estudios precedentes.

5.- DETERMINACION DE PARAMETROS SANGUINEOS. CCl_4 AL 10%/48 HORAS POSTINTOXICACION

5.1.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

53 animales (220 ± 20 g) se repartieron en los siguientes grupos:

Grupo Control (11 animales): Dosis de 5 ml/Kg de aceite de oliva, p.o.

Grupo Intoxicado (16 animales): Dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 10% V/V en aceite de oliva, p.o.

Grupo Tratado I (13 animales): Dosis de 500 mg/Kg de EM, p.o., una hora antes de la intoxicación.

Grupo Tratado II (13 animales): 3 dosis de 500 mg/Kg de EM, p.o., administradas, respectivamente, 48, 24 y 1 hora antes que el CCl_4 .

Dado que ya se había demostrado la acción hepatoprotectora de la silimarina, se omitió el tratamiento con dicha sustan-

cía. El diagnóstico de la lesión hepática se realizó a las 48 horas de la intoxicación, evaluando los niveles plasmáticos de AST, ALT, BT y BD.

5.2.- RESULTADOS Y DISCUSION

Como se apreciaba en la tabla XVII, tras la administración del EM en tres dosis de 500 mg/Kg, se produce una disminución significativa en los niveles plasmáticos de AST y ALT (Fig. XVI), con respecto al grupo Intoxicado. Este hecho indica que el EM no sólo mejora el funcionalismo hepático (14% de animales con BD detectable), sino que evita la intensificación del daño celular.

Dado que este fenómeno es evidente a las 48 horas de la inducción de la lesión tóxica, el EM actuaría facilitando el proceso de regeneración tisular. La activación del metabolismo hepático (manifiesta a dosis elevadas de tóxico y en fases más tempranas de la intoxicación) favorecería la eliminación de residuos potencialmente tóxicos y el mantenimiento general del organismo dañado. Este cuadro conduciría a una rápida recuperación del parénquima afectado, desapareciendo más prontamente los signos externos de lesión tisular (niveles plasmáticos de transaminasas).

No queda clara la influencia directa de los derivados polifenólicos como factor estricto de "hepatoprotección", aunque la acción observada al incrementar la dosis administrada parece indicarlo. Es necesario señalar que la mejora del cuadro

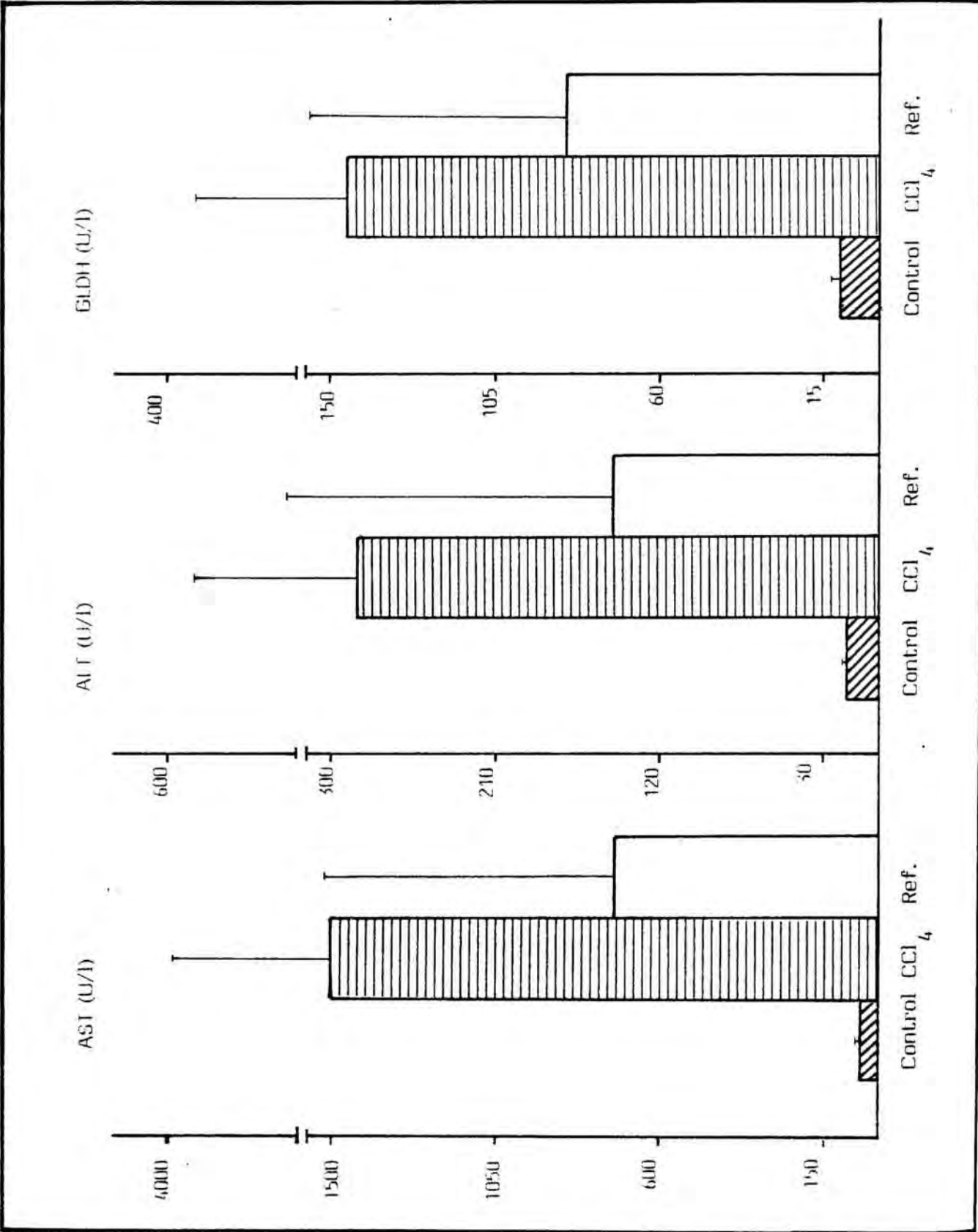


Figura XV

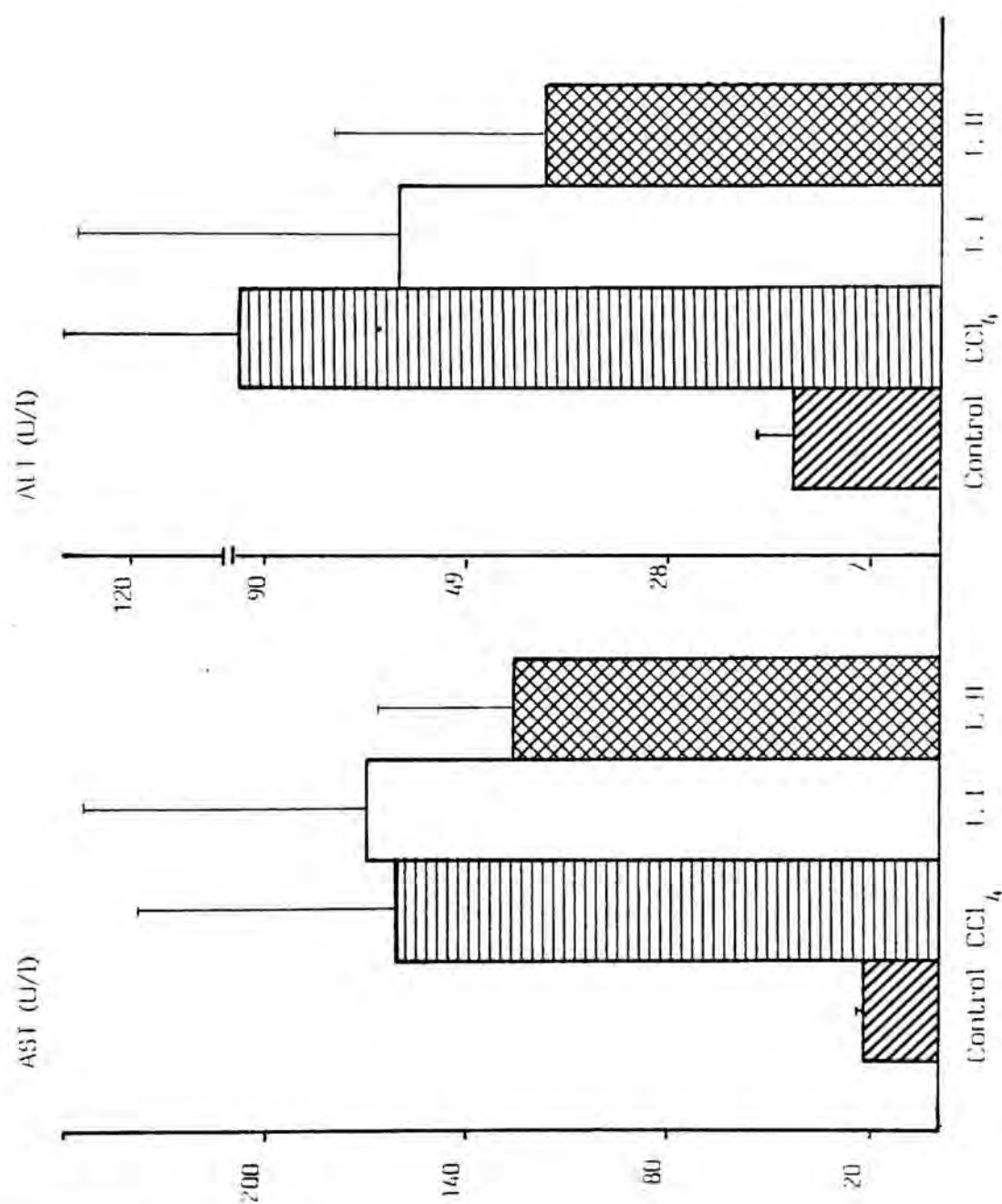


Figura XVI

tóxico se ha conseguido con un tratamiento de, aproximadamente, 16 mg/Kg de estos compuestos, mientras que la dosis efectiva de silimarina administrada ha sido de 700 mg/Kg, unas 40 veces superior.

	Control			Intoxicado			Tratado I			Tratado II		
	n	\bar{x}	n	n	\bar{x}	n	n	\bar{x}	n	\bar{x}	n	
AST (U/l)	11	22 (20- 23)	16	161 (109- 238) ^a	12	170 (114- 254) ^d	13	127 (96- 167) ^c				
ALT (U/l)	11	15 (12- 19)	16	73 (40- 132) ^a	12	56 (25- 128) ^d	13	41 (26- 63) ^b				
BT (μ M/l)	11	1,22 (0.83- 1.80)	15	2.41 (1.56- 3.71) ^a	10	2.71 (1.33- 5.52) ^d	13	2.19 (1.69- 2.82) ^d				
BD	11	0%	15	46%	1.39	50%	1.58	14%	1.23			
<div>a.- Diferencia significativa para p<0.01 respecto al grupo Control b.- Diferencia significativa para p<0.01 respecto al grupo Intoxicado c.- Diferencia significativa para p<0.05 respecto al grupo Intoxicado d.- Diferencia no significativa respecto al grupo Intoxicado</div>												

Tabla XVII

Capítulo IV.

Acción Farmacológica del
Acido Cafeico, Cinarina
y un Extracto Purificado
de Cynara scolymus L.

1.- INTRODUCCION

La gran variación que presentan los resultados experimentales en los estudios precedentes, hace que sea difícil obtener diferencias significativas entre los distintos grupos analizados.

Se pensó que el tropismo farmacológico de los extractos de Cynara scolymus L. por el hígado podía estudiarse más profundamente determinando una serie de parámetros, afectados por el CCl_4 , a nivel de tejido hepático. Estos parámetros son las concentraciones tisulares de glucógeno, triglicéridos y glutathion reducido, así como la peroxidación lipídica.

1.1.- GLUCOGENO

El glucógeno hepático actúa como reservorio para el resto del organismo. Su hidrólisis libera glucosa al torrente sanguíneo, compensando así la hipoglucemia inducida por el ayuno.

De forma general, el CCl_4 parece intervenir en el metabolismo del glucógeno por dos vías contradictorias:

El stress tóxico inducido por la administración de CCl_4 produce una descarga del sistema adrenérgico. Desde hace tiempo se conoce que los adrenoreceptores alfa-2 hepáticos reaccionan ante la presencia de neurotransmisores promoviendo la glucogenolisis.

La intoxicación por CCl_4 produce un rápido descenso en los niveles de glucosa-6-fosfatasa microsomal. Este enzima es

el responsable de la defosforilación de la glucosa-6-P, procedente de la degradación del glucógeno, posibilitando así el paso del azúcar a través de la membrana del hepatocito. De esta manera, el CCl_4 bloquearía la glucogenolisis.

El efecto neto de estas dos acciones está escasamente estudiado.

1.2.- TRIGLICERIDOS HEPATICOS. ESTEATOSIS INDUCIDA POR CCl_4

La acumulación citosólica de triglicéridos, inducida por el CCl_4 , es la resultante de una compleja variedad de efectos. Al hablar del mecanismo de acción del CCl_4 se descartó la inhibición de la síntesis proteica como causa inicial de la esteatosis.

En la actualidad, se atribuye el inicio de este fenómeno a la conjunción de tres factores:

La desnaturalización, por fenómenos redox, de las apolipoproteínas preexistentes en el hepatocito.

La inactivación de los sistemas responsables de la unión de los diferentes constituyentes de las lipoproteínas.

La alteración de los procesos excretores de lipoproteínas.

La importancia de cada uno de estos factores se desconoce exactamente, pero parece ser el segundo el que contribuye en mayor proporción. En el transcurso del tiempo otros fenómenos, tales como la inhibición de la síntesis proteica y el desacopla

miento de los procesos oxidativos mitocondriales, favorecen el acúmulo continuado de grasa.

1.3.- LIPOPEROXIDACION

Los efectos tóxicos del CCl_4 tienen, como una de sus causas, la formación de productos altamente reactivos a partir de procesos de lipoperoxidación.

Los fosfolípidos integrantes de las estructuras membranosas del hepatocito contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, con dobles enlaces no conjugados (BUEGE y AUST 1978). Considerado en un amplio sentido, el fenómeno de la peroxidación lipídica consiste en la destrucción oxidativa de estos ácidos grasos. El proceso químico detallado no se conoce con exactitud pero, en el caso del CCl_4 , se puede esquematizar según lo indicado en la figura XVII (BAST y HAENEN 1984).

El agente desencadenante (X^{\cdot}) es, como ya se ha indicado, el radical triclorometil CCl_3^{\cdot} . Asimismo, su reacción con el oxígeno conduce a la formación del radical triclorometil peróxido. Este, así como productos de su degradación (Cl^{\cdot}), son también responsables del inicio de la reacción (POHL y MICO 1984).

Como se aprecia en el esquema (Fig. XVII), la incidencia del proceso puede hacerse extensiva a todos los componentes lipídicos del sistema, dado que la cadena de reacciones se auto-perpetúa, actuando cíclicamente los productos resultantes como reactivos. En ambos tipos de peroxidación (independiente o no de la presencia de hidroperóxidos lipídicos), existe una fase

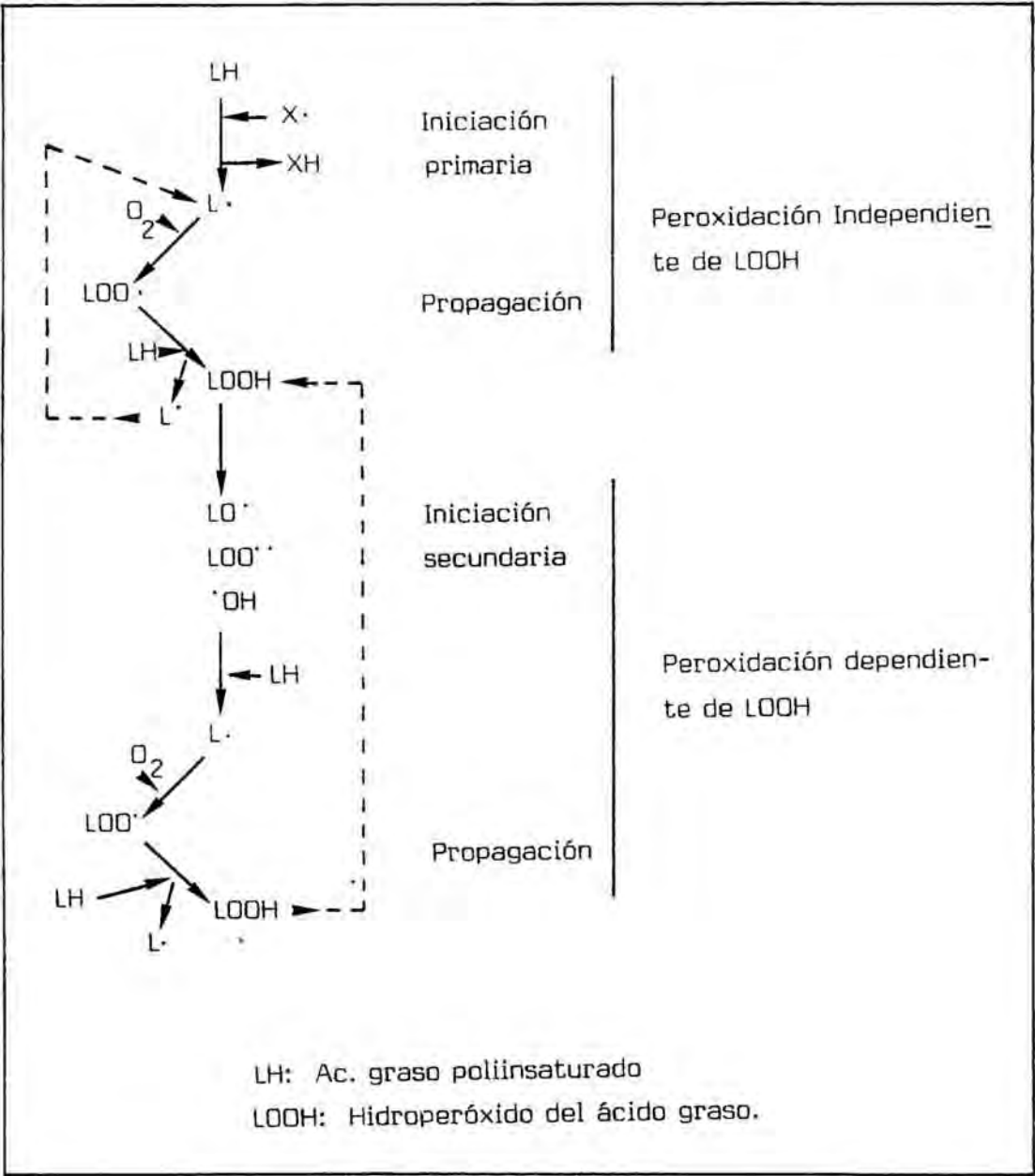


Fig. XVII

inicial de formación de radicales y otra de propagación, en la que se produce una "transferencia" de radicales entre diversos constituyentes.

Debido a la existencia de múltiples tipos de ác. grasos polienuicos, la reacción de sus radicales con el oxígeno conduce a la formación de peroxi radicales, endoperóxidos, hidroperóxidos, etc (LO^{\cdot} , LOO^{\cdot} , $LOOH$), cuya degradación implica la formación de una gran diversidad de sustancias, algunas de las cuales ya se citaron anteriormente (CURTIS y col. 1984).

El fenómeno de la peroxidación lipídica puede detenerse por dos mecanismos generales:

- # Por inactivación de los radicales que inician la cadena de reacciones.

- # Por degradación de los productos tóxicos resultantes de la degradación de los ácidos grasos.

En ambos tipos de mecanismos de protección interviene un compuesto de naturaleza peptídica, el glutathione, presente en la célula hepática.

1.4.- GLUTATHIONE

El glutathione es un tripéptido (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine, GSH), distribuido en todos los organismos vivos, que desempeña una gran variedad de funciones metabólicas. De modo sumario, el complejo metabolismo del GSH queda resumido en el esquema propuesto por MEISTER y ANDERSON (1983) (Fig. XVIII).

A.- Funciones Enzimáticas

El GSH actúa como un cofactor enzimático para enzimas tales como la glioxilasa, metil acetacetato isomerasa, formaldehído deshidrogenasa y DDT deshidrogenasa (MEISTER 1981).

B.- Ciclo del Glutamato

El ciclo del glutamato comporta la degradación y síntesis continuada del GSH (MEISTER 1984).

La degradación enzimática del GSH se inicia con la actividad de la γ -glutamil transpeptidasa (1). Este enzima cataliza la transferencia de la porción γ -glutamil a diversos aceptores (cistina, glutamina, esencialmente) y se caracteriza por encontrarse en la parte externa de la membrana celular. Esto implica un mecanismo de transporte del GSH a través de la membrana plasmática. De esta forma, órganos con mínima actividad γ -GT (como es el caso del hígado), secretan continuamente GSH al plasma, de donde es aprovechado por órganos como los riñones, que poseen una elevada actividad γ -GT.

La actividad γ -GT comporta, generalmente, la formación de γ -glutamil-aminoácidos, que son transportados nuevamente al citosol. Allí sufren la acción de la γ -glutamil ciclotransferasa (2), liberándose los aminoácidos y formándose 5-oxo-L-prolina. Esta es convertida en L-glutamato por la 5-oxo-prolinasa (3).

Por otra parte, la fracción cisteinilglicina resultante de la acción de la γ -GT se escinde por la actividad de dipepti-

dasas (4). La cisteína resultante, junto con el L-glutamato procedente de (3) se unen para formar γ -glutamylcisteína, mediante la γ -glutamylcisteína sintetasa (5). Finalmente, la GSH sintetasa (6) introduce un resto de glicina, dando lugar a la aparición del GSH. El GSH es capaz de inhibir su propia biosíntesis por retroinhibición negativa sobre (5).

La importancia del ciclo del glutamato excede de la mera síntesis de GSH. Sirve como transporte del GSH y de aminoácidos inter e intraórganos y, conjuntamente, el trasiego continuo de cisteína a través de las membranas celulares puede actuar como un mecanismo de protección.

C.- Funciones detoxificantes

GSH como reductor intracelular

Debido al carácter reductor del GSH, éste puede reaccionar con agentes oxidantes, incluso espontáneamente (frente a ciertos tipos de radicales o a una elevada tensión de oxígeno) (7). Normalmente, esta capacidad reductora es aprovechada por la célula para regenerar grupos -SH de estructuras vitales, tales como enzimas y otras proteínas, o formación de deoxi-ribonucleótidos, mediante la intervención de transhidrogenasas (8).

En cualquier caso, el GSH interviene, en condiciones de un stress oxidativo celular, eliminando los peróxidos formados. En esta acción interviene el enzima glutathion peroxidasa (9) (SIES y col. 1982), presente en dos formas:

. Selenodependiente, soluble, que interacciona principalmente con el H_2O_2 .

. Independiente de selenio, microsomal y liposoluble, que interacciona con los hidroperóxidos orgánicos.

Ambos tipos intervienen activamente en la detención de los procesos de lipoperoxidación.

En todos estos casos, la actuación del GSH conduce a la formación de GSH oxidado o GSSG. Parte de este GSSG (cuando se presenta en elevadas concentraciones) es secretado fuera de la célula y el resto sirve para regenerar GSH, mediante la GSH reductasa (10) (CARLBERG y MANNERVIK 1975), enzima dependiente de NADPH.

Mecanismos de conjugación

La interacción del GSH con compuestos electrófilos puede ser espontánea (en el caso de aldehídos, productos de la peroxidación lipídica), o bien catalizada por un amplio grupo de enzimas, denominados GSH-transferasas (11) que, al igual que la GSH peroxidasa, presentan formas citosólicas (HABIG y col. 1974) y microsomales (FRIEDBERG y col. 1979). Asimismo, pueden ser inducidas por la administración de ciertos xenobióticos (antioxidantes alimentarios) (KETTERER y col. 1984).

Los productos resultantes son transformados en mercapturos por una serie de reacciones iniciadas por la γ -GT, que transfiere la porción γ -glutamil a un aceptor (12). Por actividad de dipeptidasas se separa el resto de glicina (13) y el conjugado de cisteína es N-acetilado (14), dando lugar al derivado

del ácido mercaptúrico.

Normalmente, estos derivados son de naturaleza polar. Sin embargo, en ciertos casos se puede producir el efecto contrario, por actuación de liasas que producen tioles altamente reactivos, con propiedades tóxicas y mutagénicas (BAKKE y GUSTAFSSON 1984).

En cualquier caso, todo este tipo de mecanismos protectores conduce a una disminución en los niveles celulares de GSH, comprobada experimentalmente en intoxicaciones por diversos agentes, como ciertos narcóticos (JAMES y HARBISON 1982, JAMES y col. 1982), etanol (HETU y col. 1982), acetaminofeno (HASSING y col. 1979), etc.

El CCl_4 presenta una mayor confusión. Ciertos autores afirman que la administración del CCl_4 produce una disminución en el contenido hepático de GSH (GIORGI y col. 1984, REED y FARIS 1984). Por el contrario, experiencias realizadas por LAUTERBURG y col. (1982), demuestran que la administración de CCl_4 a animales de experimentación no modifica los niveles hepáticos de GSH. Este comportamiento se debería al mecanismo específico de producción de lipoperoxidación por parte del CCl_4 , en el que se generan mínimas cantidades de H_2O_2 y otros reactantes oxigenados. Asimismo, DUBIN y col. (1984) indican que no es condición indispensable, para que aparezcan fenómenos de peroxidación, el que se produzca una disminución de GSH.

2.- METODOS ANALITICOS

2.1.- VALORACION DE GLUCOGENO

El método utilizado es el propuesto por GUINOVART (1973). El procedimiento es el siguiente:

200 mg de muestra se digieren con 2 ml de KOH al 30% en alcohol absoluto, durante 30 minutos al baño maría hirviente. El glucógeno en solución se precipita por adición de 4 ml de etanol absoluto. A fin de facilitar el proceso, los tubos se dejan en reposo un mínimo de 6 horas. A continuación, se centrifugan a 2000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se decanta, dejando los tubos en posición invertida sobre papel de filtro. El "pellet" resultante se redisuelve en 5 ml de agua destilada.

A 0.5 ml de la solución de glucógeno se adicionan 2.5 ml de reactivo de antrona (0.05% P/V de antrona Merck, en H_2SO_4 al 70%). Los tubos se mantienen refrigerados, para evitar la formación prematura de color por la reacción exotérmica ocurrida durante la adición del reactivo.

Inmediatamente se colocan al baño maría hirviente (100 °C) durante 10 minutos. La glucosa, liberada por acción del ácido sulfúrico, reacciona con la antrona dando una coloración verde. Esta es estable durante varias horas. Las lecturas se efectúan a una λ de 620 nm, frente a un blanco realizado en idénticas condiciones.

Previamente, se obtuvo una curva de calibración a partir de soluciones de glucosa de concentración conocida (Tabla XVIII).

Glucosa ($\mu\text{g/ml}$)	Lecturas			\bar{x}
	1ª	2ª	3ª	
5	0.053	0.043	0.051	0.049
7.5	0.086	0.078	0.083	0.082
10	0.115	0.103	0.113	0.110
20	0.225	0.208	0.223	0.218
40	0.445	0.429	0.453	0.442

Tabla XVIII

$$y \text{ (D.O)} = A + B \times (\mu\text{g glucosa/ml})$$

$$A = -0.000358, B = 0.011138, r = 0.9999$$

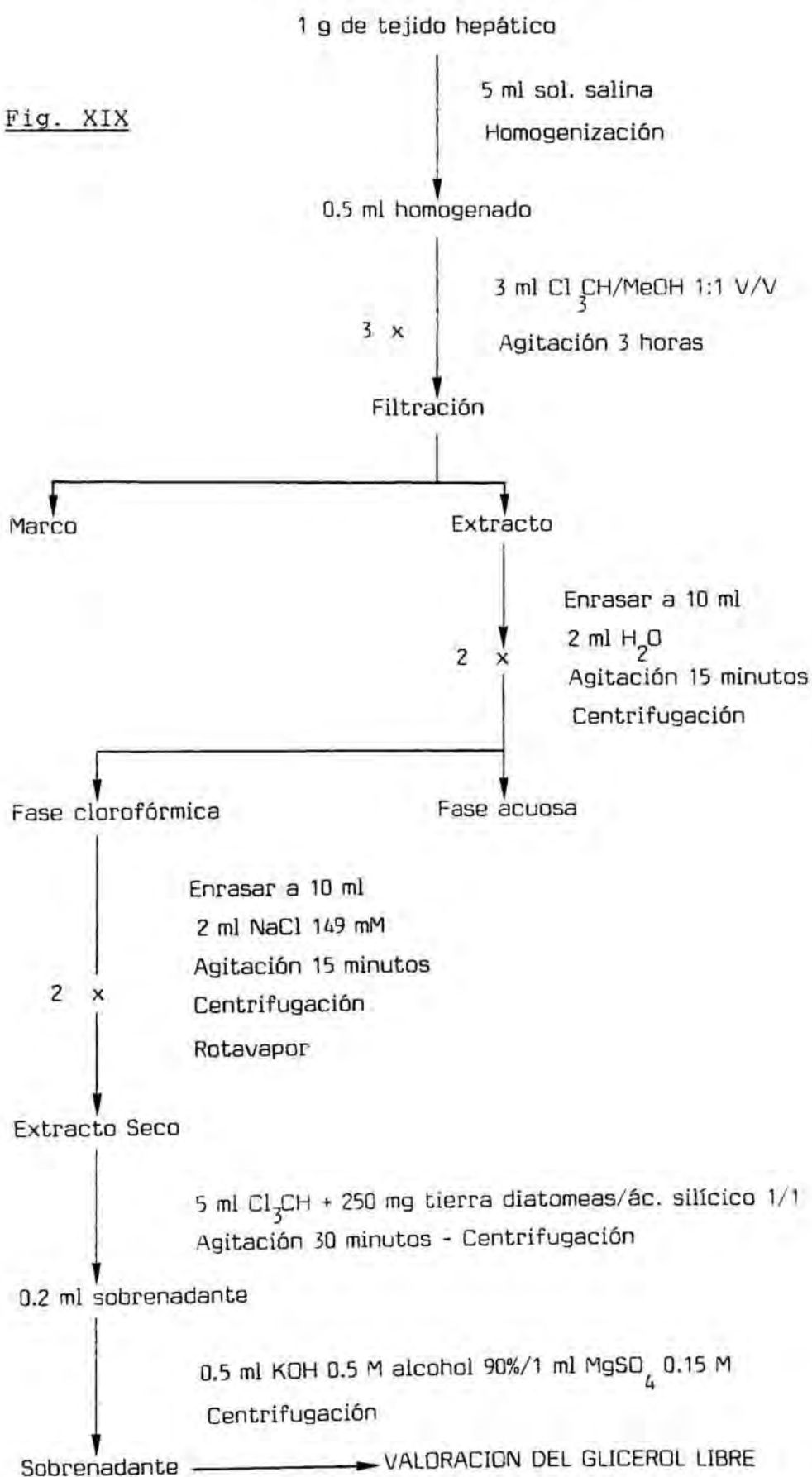
Para transformar los valores obtenidos en concentración de glucógeno, se tendrá en cuenta que 342 g de glucógeno equivalen a 360 g de glucosa.

2.2.- VALORACION DE LOS TRIGLICERIDOS HEPATICOS

Para la extracción de los triglicéridos contenidos en el tejido hepático se ha utilizado el método de FOLCH y col. (1957), con fraccionamiento parcial según las técnicas propuestas por KERPAL y col. (1961) y HERRERA (1970) (Fig. XIX).

Extracción de los lípidos hepáticos

Fig. XIX



La muestra (aproximadamente 1 g de tejido hepático) se coloca en un tubo graduado, enrasando a un volumen final de 5 ml con solución salina (NaCl 149 mM). A continuación, se efectúa una homogenización mecánica del tejido, en Potter de vidrio con vástago de teflón. El proceso se realiza durante 20-30 segundos, a una velocidad de 6500 rpm y en frío.

0.5 ml del homogenado se colocan en un tubo de cierre hermético (tubo A), se añaden 3 ml de una mezcla cloroformo/metaanol (2:1 V/V) y se mantiene en agitación mecánica durante 3 horas. Se filtra la suspensión (papel Whatman nº 43, exento de grasa) sobre otro tubo de cierre hermético (tubo B), guardando el filtrado a 4 °C. El filtro, junto con los restos de tejido, se introduce de nuevo en el tubo A, se adicionan 3 ml de la mezcla cloroformo/metanol y se somete de nuevo a agitación. Este proceso se repite de nuevo.

Al final, el tubo B contendrá un volumen aproximado de unos 9 ml, que se enrasan a 10 ml con la mezcla de solventes. Este extracto orgánico contendrá, además de los lípidos, sustancias solubilizadas en el metanol, como glicerol, glúcidos y aminoácidos. A fin de eliminarlos, se procede al lavado del extracto.

Para ello, a los 10 ml de líquidos extractivos se añaden 10 ml de agua destilada y se mantienen en agitación mecánica durante 15 minutos. De esta manera, las impurezas pasan a la fase hidro-metanólica. Por centrifugación a 1000 rpm, 10 minutos, se separan las fases, eliminando la superior.

La fase clorofórmica se enrasa de nuevo a 10 ml con meta-

nol y se repite el proceso de lavado. A continuación, se realiza el mismo procedimiento otras dos veces, pero utilizando solución salina fisiológica, con el fin de restituir la fuerza iónica del medio.

Fraccionamiento de los triglicéridos

El extracto orgánico obtenido contiene, junto a los triglicéridos, fosfolípidos que pueden interferir en la valoración, por lo que es preciso eliminarlos.

Para ello, el extracto se lleva a sequedad en rotavapor, a una temperatura inferior a los 30 °C. El residuo seco se redisuelve en 5 ml de cloroformo.

Paralelamente, se prepara una mezcla de tierra de diatomeas (Kieselgur, Muster) y ácido silícico (Kieselgel 60 G, Merck), 1:1 P/P. Esta mezcla se lava tres veces consecutivas con cloroformo, a fin de eliminar la materia grasa adherida, y se activa a 110 °C durante 2 horas.

Finalizada la activación, se colocan unos 250 mg de mezcla en el tubo que contiene los 5 ml de extracto clorofórmico y se mantiene en agitación mecánica durante 30 minutos. En este tiempo, los fosfolípidos presentes quedan absorbidos en el soporte sólido (SARDESAI y MANNING 1968).

Por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos, se obtiene un sobrenadante claro, que se conserva a -30 °C hasta el momento de la valoración.

Valoración de los triglicéridos (RAMIREZ 1981)

0.2 ml del sobrenadante clorofórmico se llevan a sequedad. Al residuo seco se le añaden 0.2 ml de agua destilada y 0.5 ml de KOH 0.5 M en etanol al 90%. La hidrólisis de los triglicéridos se realiza a 85 °C durante 2 horas. Para evitar pérdida por evaporación, el proceso se realiza en tubos de cierre hermético.

Una vez frío el hidrolizado, se precipitan los ácidos grasos libres por adición de 1 ml de MgSO_4 0.15 M. Tras centrifugación a 2400 rpm durante 30 minutos, se valora en el sobrenadante el glicerol liberado. El método utilizado es el descrito para la cuantificación de los triglicéridos plasmáticos (ver apartado 3.3., Capítulo I).

Conjuntamente con la muestra se realiza un blanco con agua destilada.

2.3.- VALORACION DE LA PEROXIDACION LIPIDICA

La cuantificación de la peroxidación lipídica se puede realizar por diversos métodos. Los más utilizados son:

Cuantificación de los gases espirados (etano y propano) por animales intoxicados.

Detección de las variaciones aparecidas en el espectro de absorción (210-300 nm) de extractos lipídicos (RUSHMORE y col. 1984).

Valoración del malondialdehído (MDA) y productos resul

tantes, formados en el proceso de peroxidación. Denominado método del ácido tiobarbitúrico (TBA), ha sido el utilizado en este trabajo. Para su aplicación, se han seguido las modificaciones introducidas por OHKAWA y col. (1979):

1 g de tejido hepático se homogeniza mecánicamente con KCl al 1.15%, de forma idéntica a la descrita en el apartado anterior, en un volumen total de 10 ml.

La mezcla de reacción consta de:

Homogenado,.....	0.2 ml
Sodio dodecilsulfato SDS al 8.1%,.....	0.2 ml
Ac. acético al 20%, ajustado a pH 3.5 con NaOH.....	1.5 ml
TBA (Fluka) al 0.8% en Tris (Tris-(hidroxi-metil)aminometano) 0.26 M.....	1.5 ml
Agua destilada c.s.p.	4.0 ml

La mezcla de reacción se mantiene a 90-95 °C, durante 60 minutos, utilizando un sistema refrigerante para evitar su concentración.

Una vez transcurrido este tiempo, se enfría el recipiente y se añaden 1 ml de agua destilada y 5 ml de una mezcla n-butanol/piridina (15:1 V/V). Por agitación vigorosa, el color rojo desarrollado pasa a la fase orgánica, que se separa por centrifugación a 4000 rpm, durante 10 minutos. La absorbancia de la fase orgánica se determina a 532 nm, utilizando como blanco la mezcla butanol/piridina.

Los resultados se expresan en nmol MDA/g tejido. El coe-

ficiente de extinción molar del MDA es $1.56 \cdot 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ l.}$

2.4.- VALORACION DEL GLUTATION REDUCIDO

Para la valoración del GSH se ha utilizado el método de ELLMAN (1959), según las modificaciones introducidas por SED-LACK y LINDAY (1968) y RIDDLES y col. (1979).

1 g de tejido hepático se homogeniza mecánicamente en 6 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% en EDTA 1 mM. La homogenización se realiza en frío.

La proteína precipitada se sedimenta por centrifugación a $1000 \times g$, durante 15 minutos (centrífuga Beckman J2-21, rotor JA-21), a 4°C . La mezcla de reacción consiste en:

Sobrenadante desproteinizado.....	0.40 ml
Tampón fosfato sódico 0.01 M, pH 8.0.....	4.55 ml
Ac. 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (Fluka), 0.01 M, en citrato sódico al 10% (según KUO y HOOK 1982).....	0.05 ml

Al cabo de 15 minutos, el color amarillo desarrollado se valora a 412 nm, frente a un blanco realizado en idénticas condiciones, pero utilizando como muestra 0.4 ml de solución de TCA al 5% en EDTA 1 mM.

Antes de realizar las experiencias, se efectuó una curva patrón, a partir de soluciones de GSH (Merck) de concentración conocida (tabla XIX).

(GSH) ($\mu\text{mol/ml}$)	Lecturas			
	1ª	2ª	3ª	\bar{x}
1.796	2.013	2.007	1.996	2.005
1.596	1.800	1.791	1.791	1.794
1.330	1.504	1.494	1.492	1.496
0.998	1.133	1.121	1.120	1.124
0.665	0.749	0.749	0.744	0.747
0.332	0.365	0.364	0.364	0.364
0.166	0.170	0.174	0.171	0.171
0.083	0.080	0.086	0.080	0.082
0.041	0.037	0.035	0.035	0.035
0.020	0.021	0.021	0.021	0.021

Tabla XIX

$$y \text{ (}\mu\text{mol GSH/ml)} = A + B \times (\text{D.O.})$$

$$A = -0.00821, B = 1.12723, r = 0.99996$$

2.5.- VALORACION DE PROTEINAS TOTALES

Como referencia para la mayoría de los parámetros anteriormente citados se utilizará el contenido proteico del tejido hepático. La valoración del mismo se realizó según el método propuesto por LOWRY y col. (1951), modificado por MILLER (1959), utilizando los siguientes reactivos:

Reactivo de Folin-Ciocalteau (Merck), diluido al 1/11 en agua destilada.

Reactivo cupro-alkalino:

CuSO_4 al 1%.....	1 ml
Tartrato sódico-potásico al 2%.....	1 ml
Na_2CO_3 al 10% en NaOH 0.5 N.....	20 ml

Dado que el método no es lineal a concentraciones superiores a 400 μg de proteína/ml, las muestras se han de diluir convenientemente antes de realizar la valoración.

La mezcla de reacción consta de:

Homogenado hepático.....	1 ml
Reactivo cupro-alkalino.....	1 ml

Transcurridos 10 minutos a temperatura ambiente

Reactivo de Folin-Ciocalteu.....	3 ml
----------------------------------	------

Este último reactivo se ha de añadir manteniendo la mezcla en agitación constante.

Al cabo de 10 minutos a 50 °C de temperatura, y una vez refrigerada la solución, se puede valorar el color azul desarrollado a 540 nm. El blanco se realiza utilizando como muestra 1 ml de la solución utilizada para la homogenización del tejido hepático.

La curva patrón se efectuó a partir de soluciones de sero albúmina bovina (SBA, Merck) de concentración conocida, obte-

niéndose los siguientes resultados (Tabla XX):

BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Lecturas				\bar{x}
	1ª	2ª	3ª	4ª	
50	0.150	0.151	0.151	0.146	0.150
100	0.277	0.280	0.285	0.279	0.280
200	0.519	0.520	0.534	0.531	0.526
400	0.998	0.948	0.968	0.987	0.975

Tabla XX

$$y \text{ (D.O.)} = A + B \times (\mu\text{g BSA/ml})$$

$$A = 0.04282, B = 0.00234, r = 0.99956$$

3.- ESTUDIO DE LA PEROXIDACION LIPIDICA

3.1.- ELECCION DEL TIEMPO IDONEO DE INTOXICACION

3.1.1.- Protocolo Experimental

20 animales (180 ± 10 g) se distribuyeron en 2 grupos de estudio:

Grupo Control (10 animales): Dosis de 2.5 ml/Kg de aceite de oliva, p.o.

Grupo Intoxicado (10 animales): Dosis de 2.5 ml/Kg de

CCl_4 al 50% en aceite de oliva, p.o.

En ambos grupos, los animales se repartieron en dos lotes, intoxicados, respectivamente, a las 10.00 (mañana) y las 16.00 horas (tarde). En todos los casos, las ratas permanecieron en ayunas, con agua "ad libitum", 18 horas antes de la intoxicación y hasta el momento del sacrificio. Este se realizó por decapitación, a los 30 minutos de la administración (CCl_4 o aceite). Previamente, se inyectaron, por vía subcutánea, 0.2 ml de heparina sódica (Leo) al 5%.

Una vez sacrificado el animal, se perfundió el hígado, vía vena porta, con unos 30 ml de suero fisiológico a 4 °C, a fin de eliminar la sangre remanente. A continuación, se extrajo y pesó el hígado. La muestra de tejido se obtuvo del lóbulo central, determinándose el nivel de peroxidación lipídica según la técnica descrita anteriormente.

3.1.2.- Resultados y Discusion

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XXI. Los niveles de peroxidación en los animales intoxicados no se diferencian significativamente de los obtenidos en los animales control, independientemente de la hora en que se realice la administración del tóxico. Únicamente existe diferencia significativa, para el porcentaje Peso Hígado/Peso Corporal (PH/PC), en los animales tratados a las 16.00 horas, lo que indicaría una mayor incidencia del proceso desencadenado por el CCl_4 .

En cualquier caso, y dado que la peroxidación lipídica pa

Mañana	Control			Intoxicado		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
PH/PC nmol MDH/g	5	2.95	± 0.27	5	3.15	± 0.45
	5	124.04	± 25.38	5	140.32	± 34.95
Tarde PH/PC nmol MDH/g	5	3.02	± 0.20	5	3.41 [*]	± 0.37
	5	96.03	± 13.35	5	106.60	± 32.84
* Diferencia significativa para $p < 0.05$						

Tabla XXI

rece no verse afectada por la hora de administración del tóxico, se eligió realizar la intoxicación a las 10.00 horas.

3.2.- EVOLUCION TEMPORAL DEL PROCESO DE LIPOPEROXIDACION

3.2.1.- Protocolo Experimental

46 animales (190 ± 10 g) se distribuyeron en dos grupos, Control e Intoxicado, con idéntico tratamiento que en el apar-

tado anterior. El sacrificio de los animales se realizó a las 2, 8, 24 y 48 horas de la intoxicación. Para evitar la muerte por inanición, se suministró agua glucosada (10%), a partir de las 24 horas postintoxicación.

3.2.2.- Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos se expresan en la tabla XXII. Tanto el cociente PH/PC como la producción de MDA están elevados significativamente a partir de las 8 horas postintoxicación, alcanzando el máximo a las 24 horas. Esto indica una estrecha correlación entre el proceso inflamatorio hepático, representado por el cociente PH/PC y desencadenado como respuesta a la agresión del CCl_4 , y la peroxidación lipídica.

Asimismo, para ambos parámetros, se inicia un ligero descenso a las 48 horas de la administración del tóxico (Figuras XX y XXI). Ello se debería a la metabolización del MDA y otros aldehídos por los sistemas fisiológicos (aldehído-deshidrogenasa, etc).

En la figura XXI se representa la evolución de la peroxidación lipídica en función del tiempo. Se puede apreciar la existencia de dos fases (ya descritas anteriormente):

Fase de iniciación, con una escasa producción de MDA, que correspondería al período comprendido entre las 0 y las 8 horas.

Fase de propagación, a partir de las 8 horas postintoxicación, en la que se genera una mayor cantidad de MDA.

%PH/PC

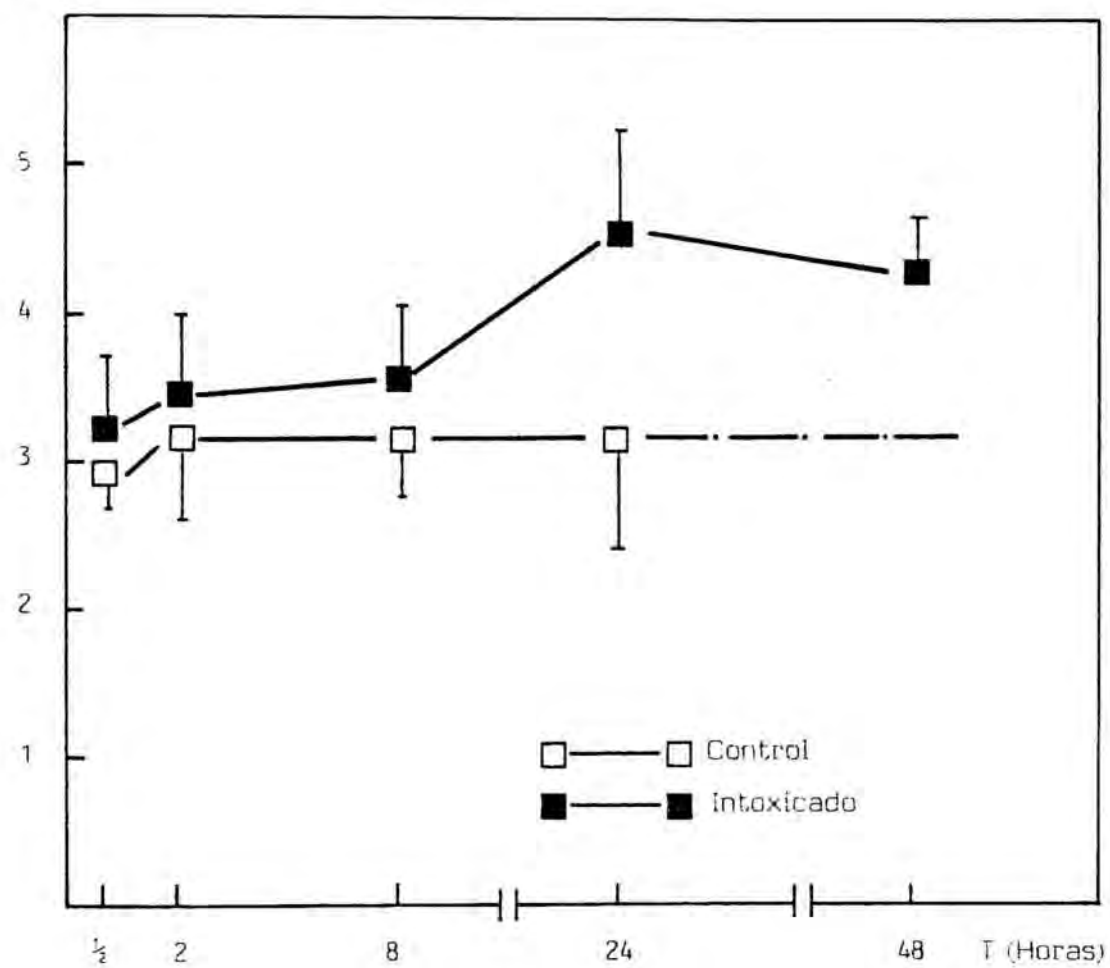


Figura XX

PH/PC	Control			Intoxicado		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
$\frac{1}{2}$ h	5	2.95	± 0.27	5	3.15	± 0.45
2 h	7	3.17	± 0.50	7	3.47	± 0.50
8 h	7	3.13	± 0.29	7	3.54*	± 0.44
24 h	6	3.16	± 0.67	7	4.51*	± 0.70
48 h	-	-----	-----	6	4.31*	± 0.34
nmol MDA/g						
$\frac{1}{2}$ h	5	124.04	± 25.38	5	140.32	± 34.95
2 h	7	139.38	± 49.34	7	167.45	± 39.10
8 h	7	145.39	± 35.99	7	449.17*	± 220.43
24 h	6	141.08	± 34.60	7	3776.87*	± 1798.50
48 h	-	-----	-----	6	2862.59*	± 2055.26
* Diferencia significativa para $p < 0.01$ con respecto al grupo Control						

Tabla XXII

Este último período correspondería a la propagación de la lesión fuera de la región microsomal, afectando a estructuras tales como mitocondrias, membranas plasmáticas, etc.

Igualmente, se observa que la situación de ayuno no influye en los niveles basales de peroxidación, ya que éstos se mantienen constantes durante toda la experiencia en el grupo de animales control.

Este estudio permite confirmar que la técnica del ácido tiobarbitúrico detecta la producción de lipoperoxidación "in vivo", hecho cuestionado por algunos autores (PLAA y HEWITT 1982).

La variabilidad individual de las respuestas frente al tóxico produce una gran dispersión en los resultados obtenidos para el grupo Intoxicado. Por ello, se consideró que las 24 horas postintoxicación, período de tiempo de máxima diferencia entre el grupo Control e Intoxicado, es el momento idóneo para la evaluación de una actividad hepatoprotectora.

4.- ESTUDIO DEL CONTENIDO EN GLUCOGENO, TRIGLICERIDOS Y GLUTATION HEPATICO TRAS LA INTOXICACION POR CCl_4

4.1.- ELECCION DEL TIEMPO IDONEO DE INTOXICACION

4.1.1.- Protocolo Experimental

Los niveles de los tres parámetros citados y, especialmente del GSH, se ven afectados por ritmos circadianos (GIORGI y

col. 1984). En consecuencia, se realizó un estudio previo para determinar la influencia, sobre los niveles de glutathione, del período del día en el que se realizaba la intoxicación.

Para ello, 24 animales (220 ± 20 g) se repartieron en dos grupos de estudio:

Grupo Control (12 animales): Dosis de 5 ml/Kg de aceite de oliva, p.o.

Grupo Intoxicado (12 animales): Dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 10% V/V en aceite de oliva, p.o.

En ambos grupos, los animales se distribuyeron en dos lotes. Uno de ellos se administró a las 10.00 horas (mañana) y el restante a las 16.00 horas (tarde). Al cabo de 48 horas de la intoxicación los animales se sacrificaron por decapitación, permaneciendo durante este tiempo en ayuno, con agua "ad libitum". Al igual que en el estudio de la lipoperoxidación, previamente se inyectaron 0.2 ml de heparina sódica (Leo) al 5%, vía subcutánea, a cada animal.

El hígado se perfundió, vía vena porta, con suero fisiológico a 4 °C. A continuación, se registró su peso y se tomó una muestra de tejido del lóbulo central para la determinación del contenido en GSH.

4.1.2.- Resultados y Discusión

Una de las primeras conclusiones que resultan de la observación de los resultados (Tabla XXIII) es la gran variabilidad en los niveles de GSH en función del momento en que se determi-

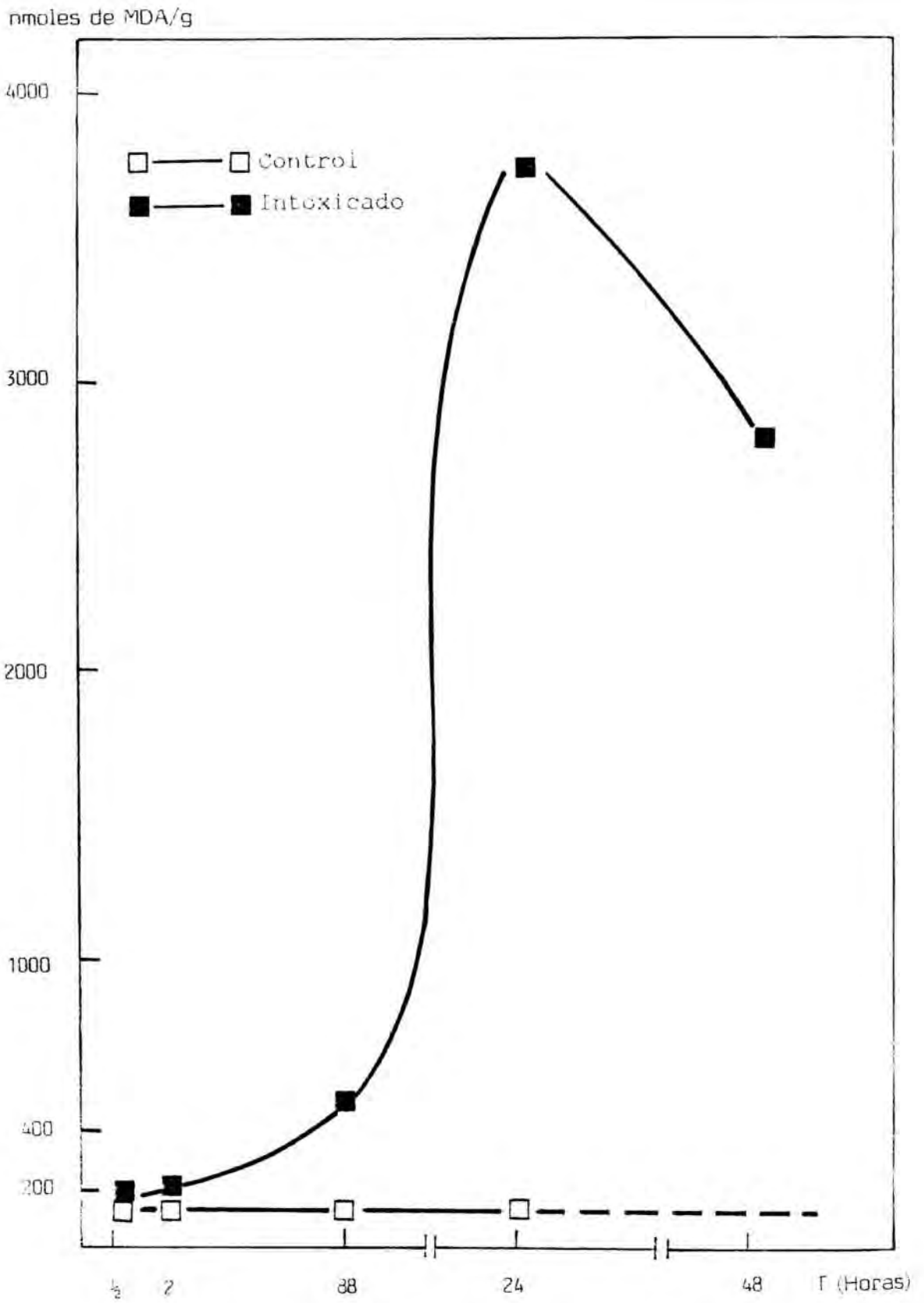


Figura XXI

Mañana	Control			Intoxicado		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
PH/PC $\mu\text{mol GSH/g}$	7	2.83	± 0.39	7	3.64*	± 0.43
	7	5.38	± 1.52	7	7.24*	± 1.44
Tarde PH/PC $\mu\text{mol GSH/g}$	5	3.00	± 0.48	5	3.31	± 0.10
	5	3.15	± 1.52	5	5.93*	± 0.92
* Significativo para $p < 0.01$ respecto al grupo Control.						

Tabla XXIII

nen. Así, dentro del grupo Control existe una diferencia superior a dos unidades ($5.38 \mu\text{mol/g}$ con respecto a $3.15 \mu\text{mol/g}$) según se haya realizado la valoración a las 10.00 o a las 16.00 horas, respectivamente.

La administración de CCl_4 produce un incremento significativo en los niveles de GSH a las 48 horas de la intoxicación. En este caso, la elevación se produce independientemente del momento de la intoxicación, pero es mayor cuando ésta se realiza a las 16.00 horas.

Por el contrario, únicamente es detectable un aumento significativo en la relación PH/PC, en aquellos animales intoxica-

dos a las 10.00 horas, evidenciando una mayor progresión en el proceso inflamatorio en este período. Aunque este comportamiento es inverso al descrito en el estudio de la peroxidación lipídica (apartado 3.1.2.), los resultados no son estrictamente comparables, ya que en este caso los animales no se encuentran en ayuno previo al momento de la intoxicación.

Dado que los niveles de GSH se modificaban más intensamente en los animales intoxicados a las 16.00 horas, se escogió este tiempo como idóneo para la realización de estudios posteriores.

4.2.- ESTUDIO DE LA EVOLUCION TEMPORAL

4.2.1.- Protocolo Experimental

Para este estudio se dispuso de 46 animales (220 ± 20 g), que se distribuyeron en dos grupos, Control e Intoxicado, con idéntico tratamiento al descrito en el apartado anterior. El sacrificio de los animales se llevó a cabo a las 1, 4, 18 y 24 horas de la intoxicación.

Una vez extraído y pesado el hígado, se realizó la toma de muestras:

Del lóbulo izquierdo para la determinación de glucógeno y GSH.

Del lóbulo medio para la determinación de triglicéridos y proteínas.

4.2.2.- Resultados y Discusión

En las tablas XXIV y XXV se muestran los valores medios de cada parámetro, indicando si la diferencia observada entre el grupo Control e Intoxicado, para cada tiempo, es estadísticamente significativa.

Triglicéridos (mg/100 mg proteína).						
Control				Intoxicado		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
4 h	7	2.79	± 1.32	7	7.37 ^b	± 1.88
18 h	6	8.50	± 4.71	6	22.45 ^b	± 9.90
24 h	4	4.50	± 1.78	4	24.13 ^b	± 6.54
b.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al grupo Control						

Tabla XXIV

En la figura XXII se aprecia la evolución, en función del tiempo, de la relación PH/PC, que proporciona una idea del tamaño relativo del hígado con respecto al resto del organismo. Se puede observar un incremento significativo a las 18 y 24 horas, en los animales intoxicados con respecto al grupo Control. En estos mismos tiempos, se produce una disminución significativa en el contenido proteico hepático del grupo Intoxicado (Fig. XXIII). La figura XXIV muestra la evolución, tras la administración de CCl_4 , de la relación PH/PC y el contenido proteico.

PH/PC		Control			Intoxicado		
		n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
1 h		5	3.00	± 0.17	5	3.64 ^b	± 0.47
4 h		7	3.77	± 0.49	7	3.70	± 0.43
18 h		6	3.40	± 0.29	6	4.25 ^b	± 0.46
24 h		5	2.88	± 0.31	5	4.29 ^b	± 0.39
Proteínas (mg/g)							
1 h		5	214.96	± 7.03	5	222.18	± 20.30
4 h		7	181.53	± 29.67	7	175.30	± 34.39
18 h		6	204.42	± 27.36	6	168.64 ^a	± 32.00
24 h		5	226.40	± 29.50	5	194.94 ^a	± 25.09
GSH (μ mol/100 mg proteína)							
1 h		5	3.46	± 0.26	5	3.53	± 0.41
4 h		7	2.62	± 0.46	7	3.36 ^b	± 0.50
18 h		6	3.28	± 0.27	6	4.58 ^a	± 0.69
24 h		5	2.57	± 0.18	5	3.85 ^b	± 0.53
Glucógeno (mg/100 mg proteína)							
1 h		5	42.41	± 7.50	5	45.64	± 18.87
4 h		7	14.23	± 4.85	7	3.51 ^b	± 4.01
18 h		6	0.62	± 0.19	6	5.10 ^b	± 4.23
24 h		5	0.76	± 0.60	5	2.84	± 3.14

b.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al grupo Control
a.- Diferencia significativa para $p < 0.05$ respecto al grupo Control

Tabla XXV

% PH/PC

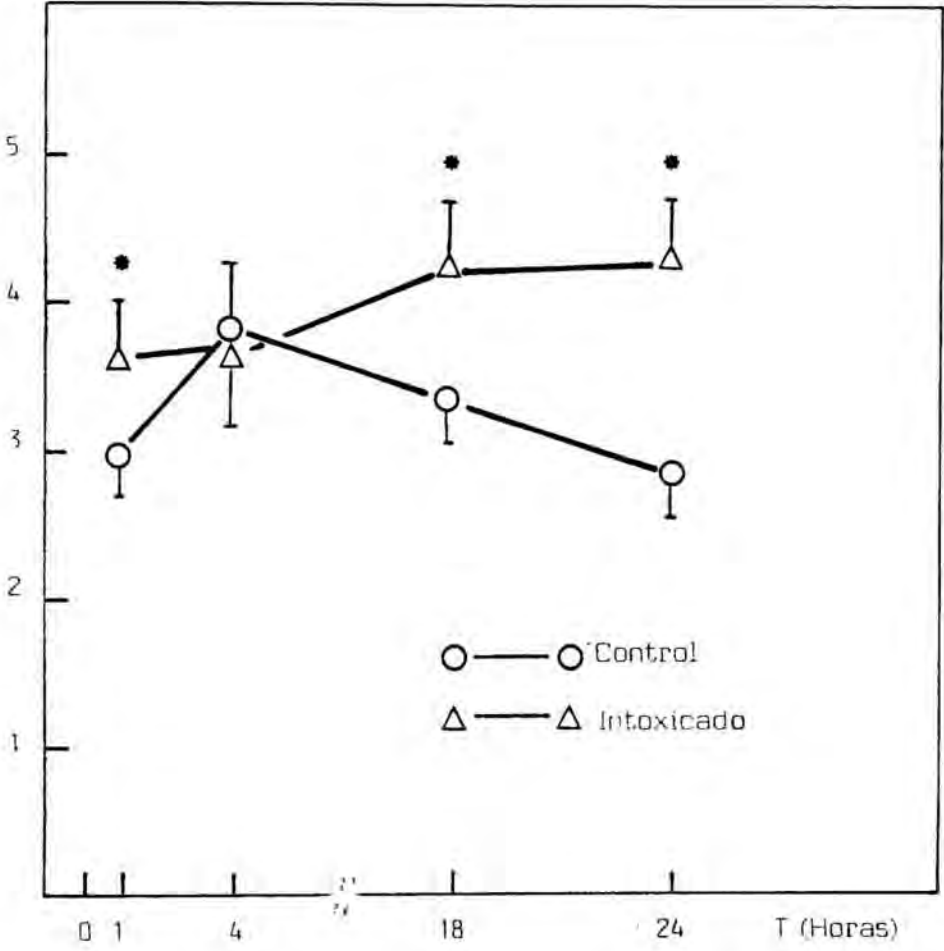


Figura XXII

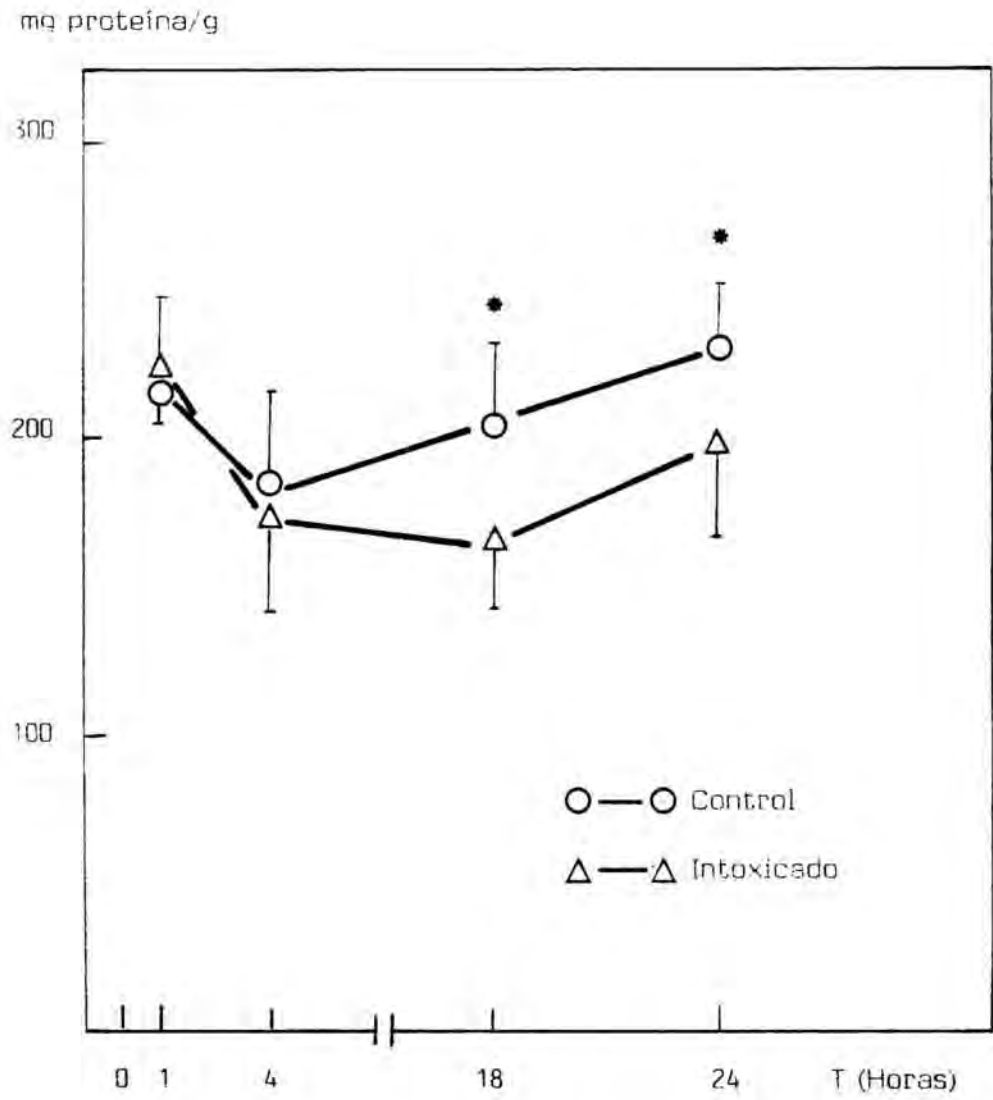


Figura XXIII

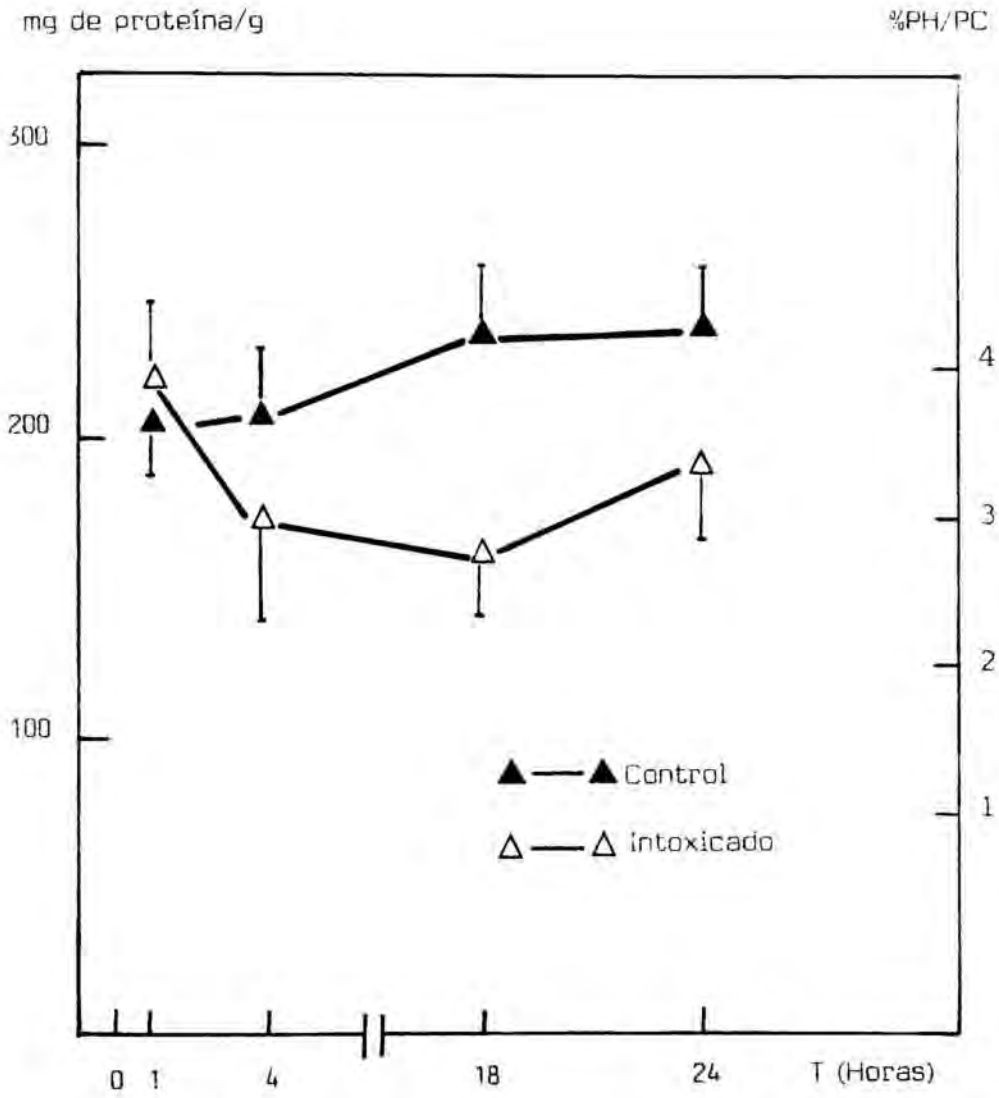


Figura XXIV

El conjunto indica una correlación entre el incremento de la masa hepática y la disminución en la concentración de proteínas (fenómeno que se produce también, en menor proporción, en el grupo Control - Fig. XXV -).

Ambos parámetros son, pues, un buen indicador del grado de inflamación hepático producido por el tóxico. La disminución proteica no se debería, exclusivamente, a una degradación de las proteínas hepáticas, sino a un efecto de dilución, producido por el acúmulo, en el interior de los hepatocitos, de líquido intersticial, consecuencia del proceso inflamatorio. Asimismo, la infiltración grasa contribuiría a la aparición de este fenómeno.

El único hecho discordante se produce a las 4 horas post-intoxicación, ya que no existe diferencia entre los grupos Control e Intoxicado para la relación PH/PC. Sin embargo, la figura XXII indica que este parámetro sufre un ritmo circadiano, contrapuesto a los niveles proteicos (Fig. XXV), alterado totalmente en los animales intoxicados. La ausencia de una diferencia se debería, no a la falta de un efecto tóxico del CCl_4 , sino a la coincidencia de que, en este tiempo, se produce un máximo en el grupo Control.

El CCl_4 produce una elevación en los niveles de GSH, detectable a partir de la 4ª hora postintoxicación, y mantenida en el tiempo (Fig. XXVI). Este incremento es progresivo, aumentando proporcionalmente con el tiempo (Fig. XXVII). Asimismo, es dosis-dependiente. A las 24 horas postintoxicación, los niveles de GSH son de $3.85 \pm 0.53 \mu\text{moles}/100 \text{ mg}$ de proteína, para

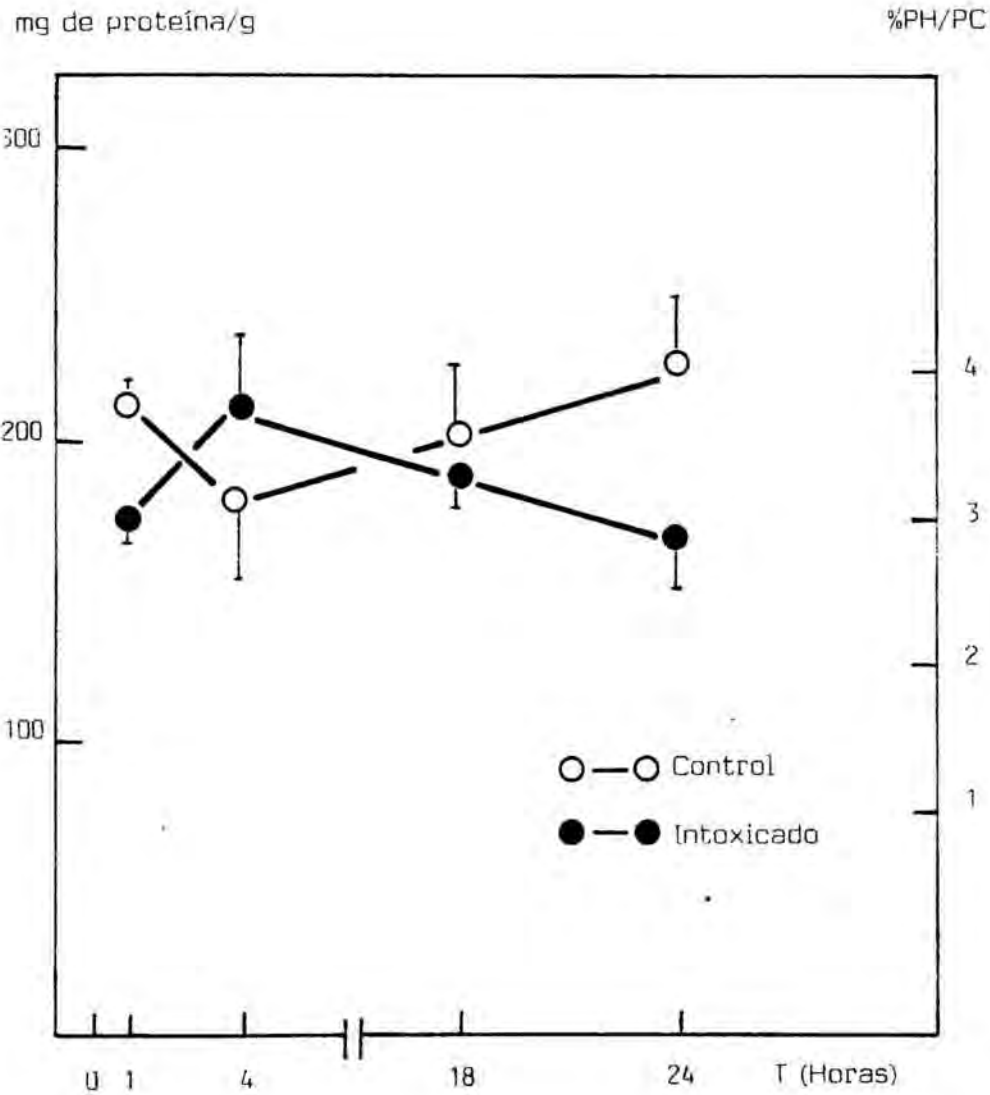


Figura XXV

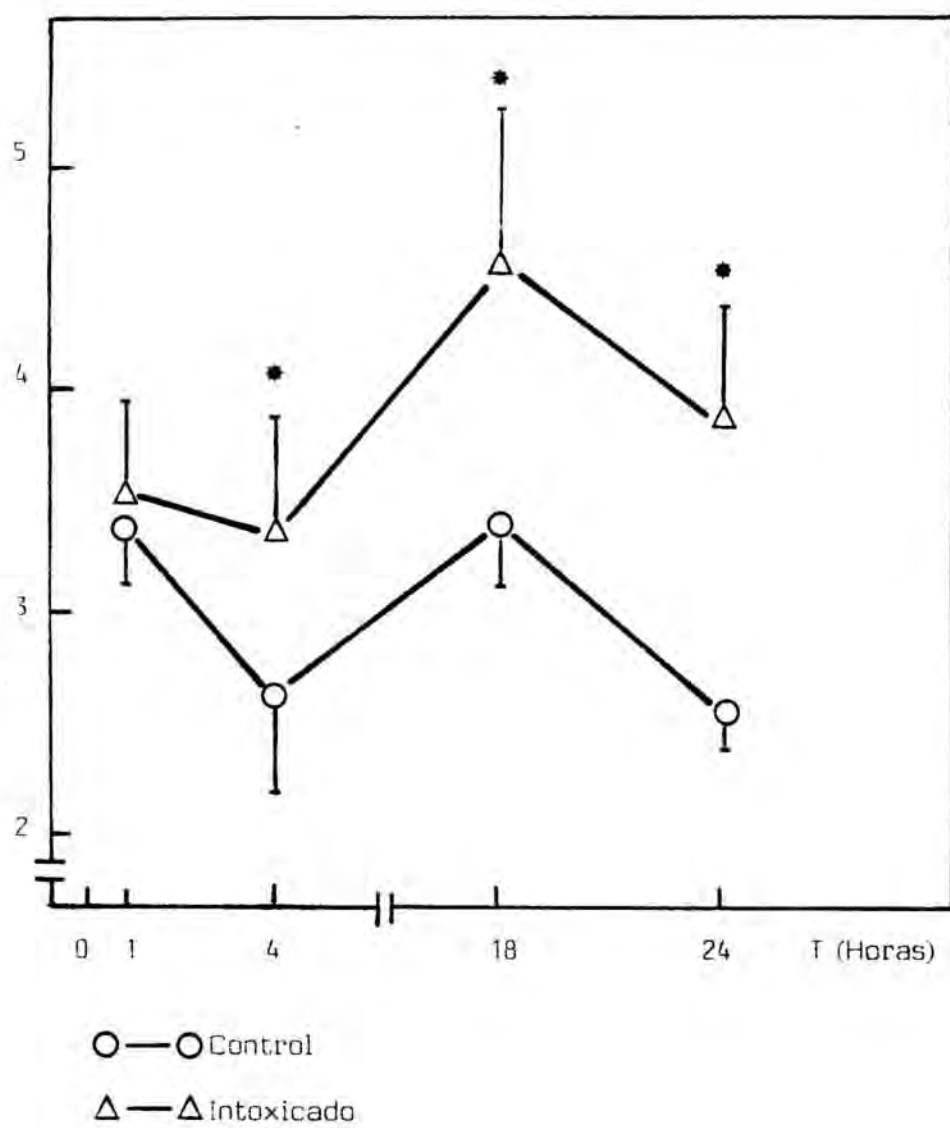
$\mu\text{mol de GSH}/100 \text{ mg de proteína}$ 

Figura XXVI

una dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 10% V/V en aceite de oliva. Si, en idénticas condiciones, se administra CCl_4 al 25%, se obtienen unos valores de 4.39 ± 0.28 μmoles de GSH/100 mg de proteína.

Por otra parte, como se aprecia en la figura XXVIII, la acción tóxica del CCl_4 presenta la particularidad de mantener el ritmo circadiano manifestado por el GSH en condiciones normales. Se ha de tener en cuenta que los animales se encuentran en ayuno, lo que explicaría el hecho de que los niveles de GSH en los animales control vayan disminuyendo progresivamente. La deficiencia en aminoácidos precursores (esencialmente cisteína) induce una deplección en la síntesis de GSH (LATERBURG 1982, REED y FARISS 1984).

No se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica que corrobore la apreciación de un incremento en los niveles de GSH tras la administración de CCl_4 . Únicamente POULSEN y col. (1981) encuentran, en pacientes afectados por hepatitis tóxica (aunque no por CCl_4), una elevación patológica en la concentración hepática de GSH. Asimismo, la ingestión crónica de etanol puede actuar en este sentido (HETU y col. 1982).

El mantenimiento de concentraciones adecuadas de GSH es un proceso dinámico y el hígado tiene la capacidad de sintetizar elevadas cantidades del mismo bajo condiciones de stress. Ya se ha indicado que la síntesis de GSH se regula por retroalimentación negativa. Un consumo incrementado de GSH, producido, por ejemplo, por la agresión tóxica, puede activar este mecanismo, que se vería reforzado por la elevación de los niveles de

% Variación GSH

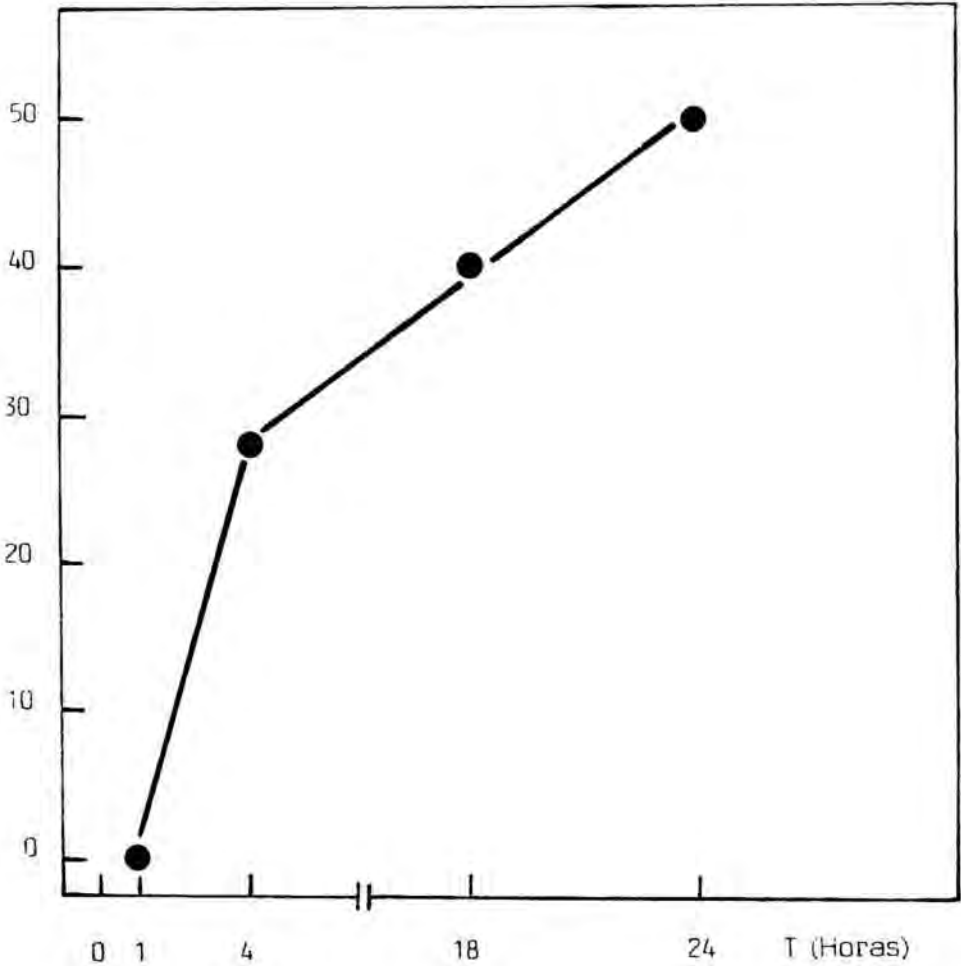
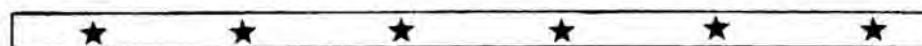
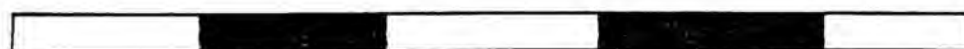
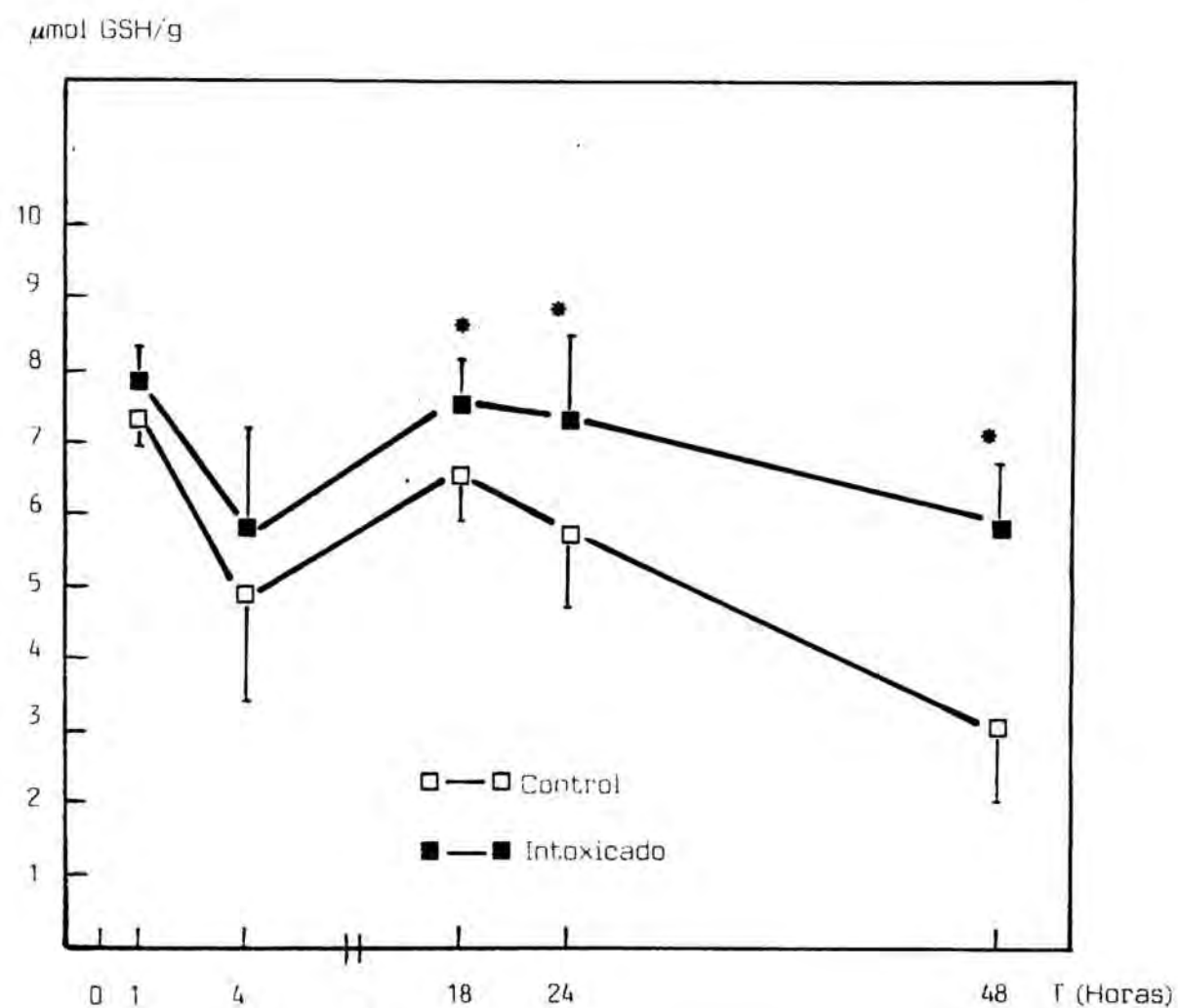


Figura XXVII



- Luz
- Oscuridad
- ★ Ayuno

Figura XXVIII

AMPC, estimulador de la síntesis de GSH.

Se ha de rechazar la hipótesis de un transporte interórganos, ya que el hígado, "per se", es el mayor productor de GSH del organismo. Sin embargo, una explicación plausible al fenómeno observado sería la existencia de un transporte intrahepático. Los resultados obtenidos reflejan la media del GSH hepático global. La disminución acusada del GSH en los hepatocitos de la zona centrolobulillar, zona diana del CCl_4 , podría estimular, indirectamente, la síntesis del tripéptido en las células periportales, más preservadas, de forma que, en su conjunto, el GSH se viera incrementado.

En cualquier caso, dada la rápida deplección del NADPH hepatocitario tras la administración del CCl_4 , se ha de rechazar la hipótesis de una regeneración del GSH a partir del GSSG producido.

El glucógeno presenta, por acción del CCl_4 , un comportamiento dual (Fig. XXIX). Mientras que a la 4ª hora postintoxicación disminuye más acusadamente en los animales intoxicados que en el grupo Control, a las 18 horas el proceso es inverso, presentando el grupo Intoxicado un mayor contenido en glucógeno. La figura XXX muestra el porcentaje de variación de los valores de glucógeno en ratas intoxicadas con respecto a los animales Control. El máximo se alcanza a las 18 horas.

En el apartado 1.1. se indicaban las dos posibles acciones del CCl_4 sobre el contenido hepático de glucógeno, que explicarían el comportamiento observado. En primera instancia (4 horas), la descarga adrenérgica producida por el tóxico con-

mg de glucógeno/100 mg de proteína

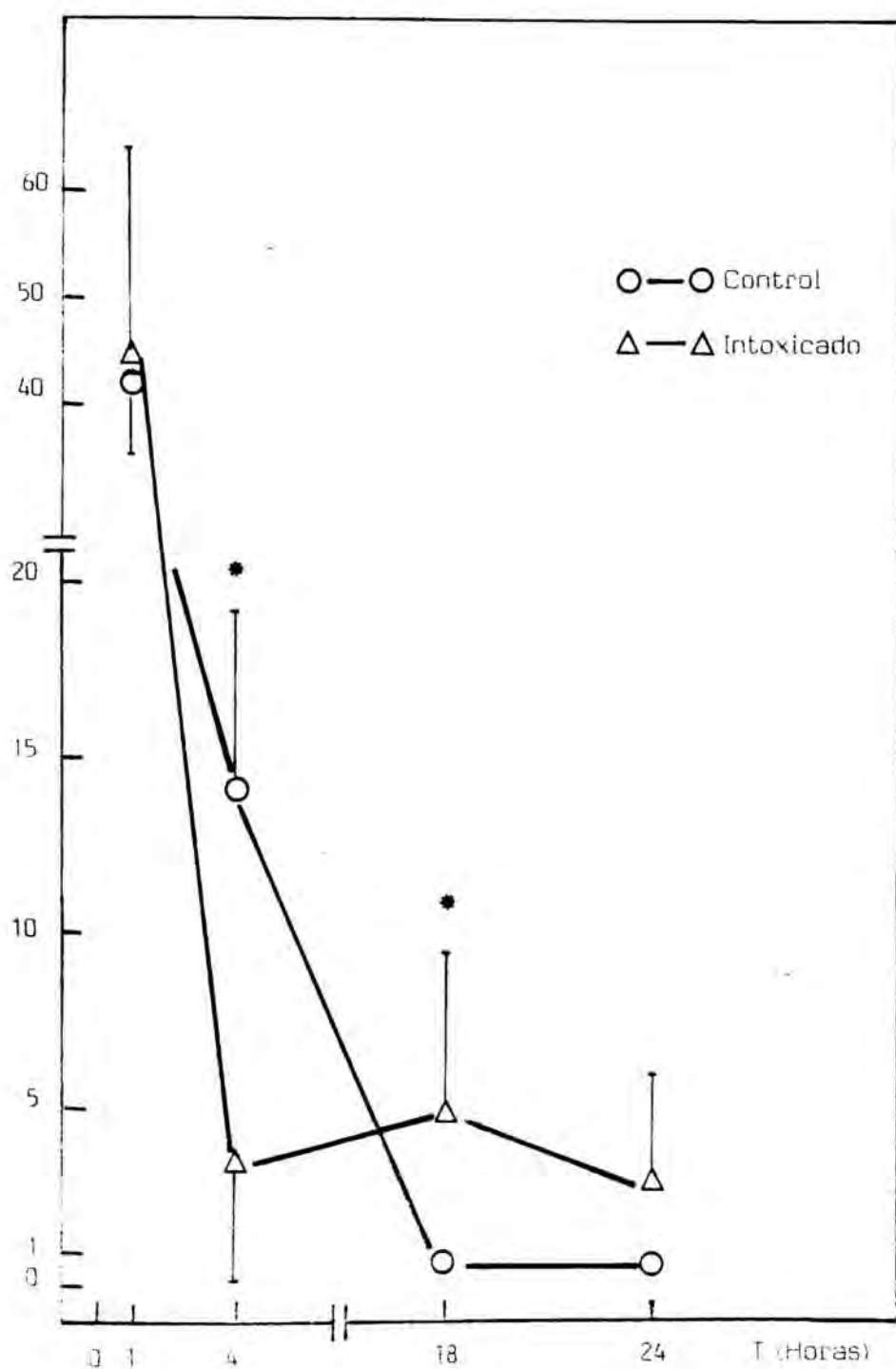


Figura XXIX

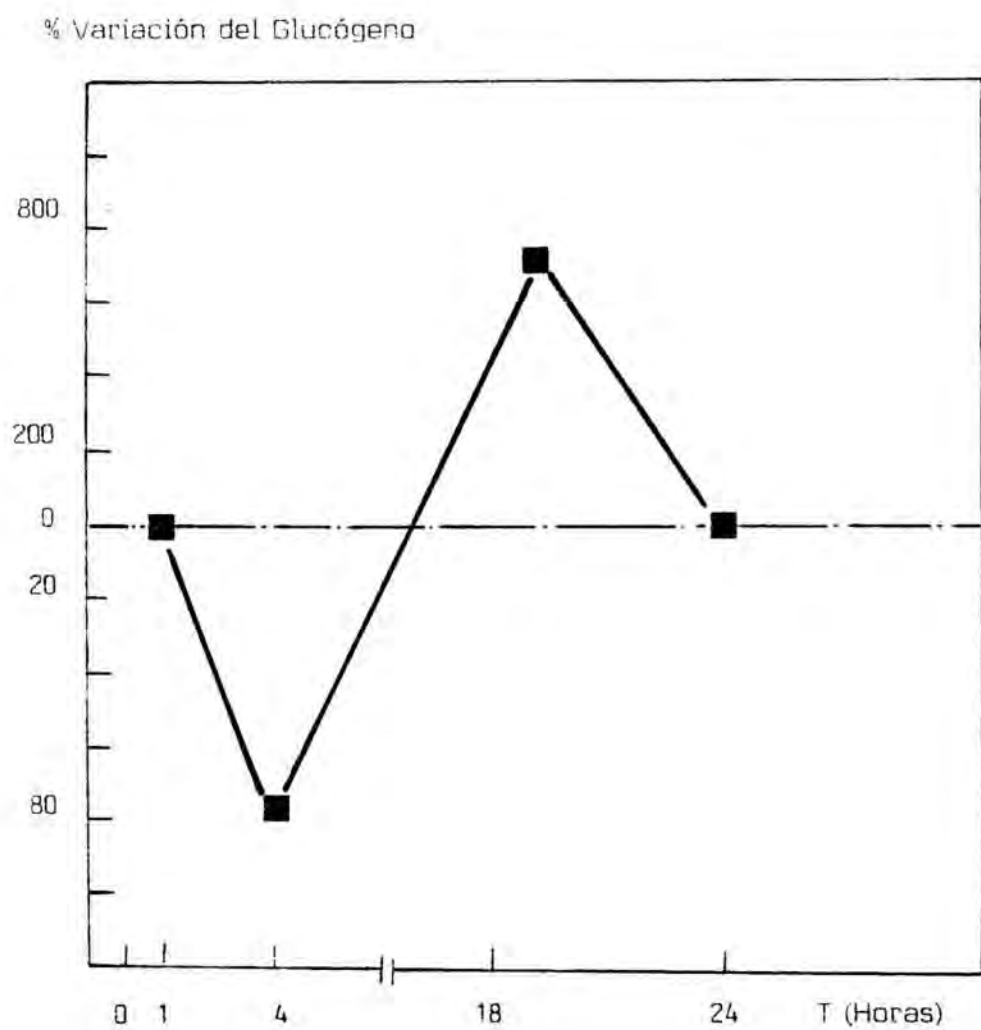


Figura XXX

duciría a una deplección mucho más acusada en los animales intoxicados. Sin embargo, este efecto se vería contrarrestado por la destrucción de la glucosa-6-fosfatasa, manifestándose (18 horas) un bloqueo de la glucogenolisis, responsable de la elevación observada en este tiempo. PHUSPENDRAN y col. (1977) demuestran, igualmente, una disminución del glucógeno hepático en ratones intoxicados con CCl_4 , pero no prolongan el estudio el tiempo suficiente para apreciar el segundo fenómeno. A las 24 horas postintoxicación no existe diferencia entre los grupos Control e Intoxicado, lo que indica que la glucosa-6-fosfato es metabolizada por vías alternativas. Una de estas vías metabólicas mayoritaria podría ser la vía del fosfogluconato. El poder reductor generado (en forma de NADPH) contribuiría a la regeneración parcial del GSH oxidado.

La esteatosis inducida por el CCl_4 es manifiesta a las 4 horas postintoxicación (Fig. XXXI). Es de destacar que el porcentaje de incremento con respecto al grupo Control se mantiene constante hasta las 18 horas postintoxicación, elevándose bruscamente a partir de este momento (Fig. XXXII), debido a la conjunción de los diversos mecanismos desencadenantes del hígado graso, ya descritos (apartado 1.2.). Se constata la incidencia de un ritmo circadiano sobre los niveles basales de triglicéridos. El ritmo cíclico se pierde tras la administración del CCl_4 .

Por último, se han de destacar dos factores:

La conveniencia de referir los parámetros estudiados al contenido proteico y no, directamente, al peso de la muestra

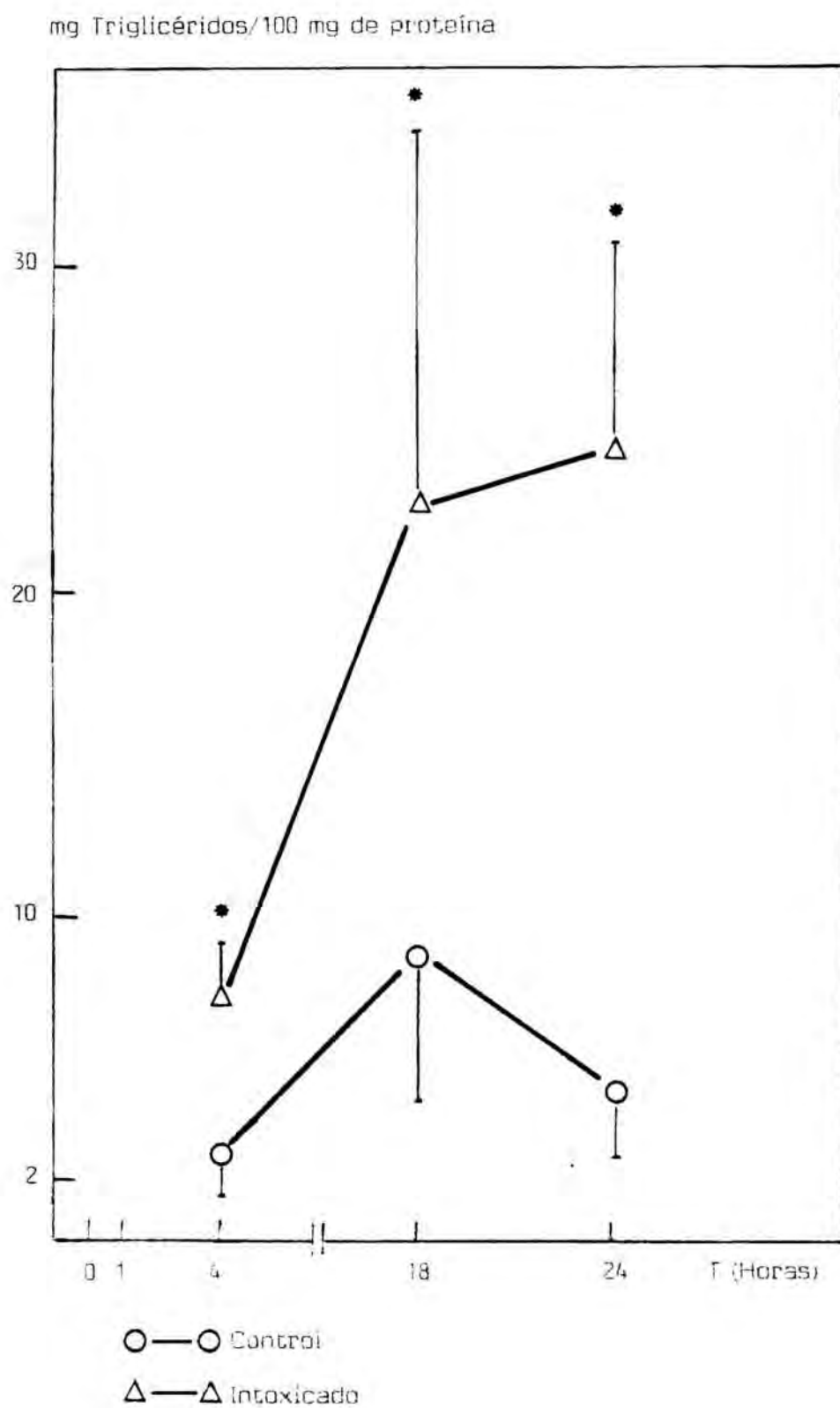


Figura XXXI

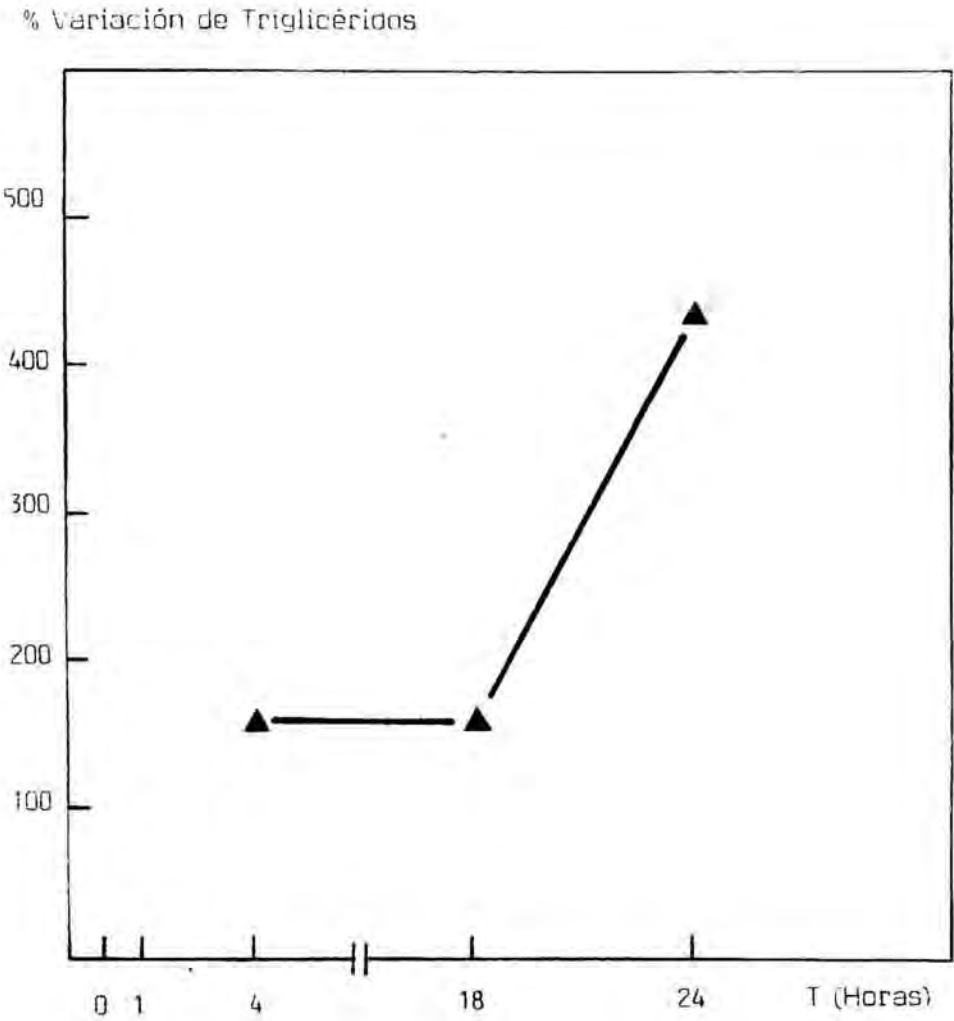


Figura XXXII

tisular utilizada. En este último caso, la retención hídrica, producida por la intoxicación, puede conllevar a errores.

Se eligió las 18 horas postintoxicación, punto en que se manifiesta más acusadamente la toxicidad del CCl_4 , como período idóneo para la evaluación de una actividad hepatoprotectora.

5.- VALORACION DE LA ACTIVIDAD FARMACOLOGICA DEL ACIDO CAFEICO, CINARINA Y UN EXTRACTO PURIFICADO DE Cynara scolymus L.

5.1.- PRODUCTOS ENSAYADOS

5.1.1.- Extracto Purificado de Cynara scolymus L.

Como material de partida se utilizó el extracto metanólico EM, cuya obtención se ha detallado anteriormente (apartado 1, Capítulo III). El procedimiento seguido se ha basado en el descrito por TIMMERMANN y col. (1983).

El extracto metanólico llevado a sequedad se redisuelve en 400 ml de agua destilada. El pH de la solución acuosa es, a proximadamente, de 5. A fin de asegurar la presencia de los derivados cafeilquínicos en un estado no ionizado, se llevó la solución a un pH de 2.9.

Se realizaron dos tipos de fraccionamiento, utilizándose acetato de etilo o n-butanol, respectivamente. La extracción se efectuó en embudo de decantación, con fracciones sucesivas de 100 ml de disolvente orgánico (volumen total: 1500 ml).

Los líquidos extractivos reunidos se llevaron a extracto seco y se redisolviéron en agua destilada (50 ml). A fin de facilitar la redisolución del extracto y su posterior administración, se ajustó el pH de la solución a 7.4, por adición de NaOH 3 N. Posteriormente, se liofilizó para facilitar su conservación.

El rendimiento de la extracción fue del 4.5% para el extracto butanólico y 1.9% para el extracto de acetato de etilo (con respecto a 100 g de droga desecada).

El análisis por cromatografía líquida de ambos extractos proporcionó la siguiente composición cuali y cuantitativa (los resultados corresponden a la media de análisis realizados sobre 3 extractos diferentes):

. Extracto butanólico .	
Ac. Neoclorogénico.....	0.957%
Ac. Criptoclorogénico.....	1.483%
Ac. Clorogénico.....	2.053%
Ac. Cafeico.....	0.116%
Ac. 1,5-dicafeilquinico.....	0.248%
Ac. 3,4-dicafeilquinico.....	0.152%
Ac. 3,5-dicafeilquinico.....	0.258%
Ac. 1,3-dicafeilquinico.....	1.572%
Ac. 4,5-dicafeilquinico.....	0.160%
7-glucosil luteolina.....	2.496%
Polifenoles totales.....	9.495%

. Extracto de Acetato de Etilo

Ac. Neoclorogénico.....	1.868%
Ac. Criptoclorogénico.....	3.408%
Ac. Clorogénico.....	4.841%
Ac. Cafeico.....	0.368%
Ac. 1,5-dicafeilquínico.....	1.563%
Ac. 3,4-dicafeilquínico.....	0.457%
Ac. 3,5-dicafeilquínico.....	0.708%
Ac. 1,3-dicafeilquínico.....	0.867%
Ac. 4,5-dicafeilquínico.....	0.575%
7-glucosil luteolina.....	3.863%
Polifenoles totales.....	18.518%

La comparación de los resultados pone de manifiesto que la extracción con acetato de etilo elimina un mayor número de impurezas, obteniéndose una fracción enriquecida en derivados polifenólicos. Por tanto, se decidió utilizar este extracto en la realización de las pruebas farmacológicas.

Para comprobar la inocuidad del producto, se efectuó la siguiente experiencia:

10 animales (200 ± 10 g) se repartieron en dos grupos de estudio:

Grupo Tratado (5 animales): Tres dosis de 3500 mg/Kg de extracto, p.o., repartidas en tres días consecutivos.

Grupo Control (5 animales): Idéntico tratamiento con

un volumen equivalente de agua destilada.

A partir de la última administración (realizada a las 15.00 horas), los animales permanecieron 24 horas en ayuno, con agua "ad libitum". A continuación, se sacrificaron, determinando los niveles plasmáticos de AST y ALT. Se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla XXVI):

	AST (U/l)			ALT (U/l)		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	5	36	± 5	5	13	± 3
Tratado	4	36	± 9	4	16	± 5

Tabla XXVI

No existe diferencia significativa en los niveles de AST y ALT detectados en los animales tratados. Sin embargo, se ha de destacar un hecho: De los 5 animales del grupo Tratado, uno murió tras la tercera administración y otro presentaba, en el momento del sacrificio, dilatación abdominal, abundante sialorrea e insuficiencia respiratoria. Al realizar la autopsia de estos animales, se observó un importante meteorismo. Asimismo

mo, las vías respiratorias (la zona alta, especialmente) se presentaban parcialmente obstruidas por una abundante mucosidad. Por el contrario, el hígado no mostraba ninguna anomalía detectable al examen macroscópico.

5.1.2.- Acido Cafeico y Cinarina

Se decidió la valoración de la actividad farmacológica de estos dos compuestos por ser integrantes de los extractos utilizados en la presente memoria y por disponer, en el momento de realización, de cantidad suficiente para permitir el diseño de experiencias "in vivo". La elección de la dosis y vía de administración se efectuó en función de la información bibliográfica existente, así como de las indicaciones proporcionadas por HERNANDEZ (comunicación personal).

5.2.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL

25 animales (180 ± 10 g) se repartieron en los siguientes grupos de estudio:

Grupo Intoxicado (6 animales): Dosis de 5 ml/Kg de CCl_4 al 10% V/V en aceite de oliva, p.o.

Grupos de Tratamiento:

A.- Extracto de Acetato de Etilo (5 animales): Tres dosis de 2000 mg/kg de extracto, p.o.

B.- Extracto de Acetato de Etilo (4 animales): Tres dosis de 1000 mg/Kg de extracto, p.o.

C.- Cinarina (5 animales): Tres dosis de 150 mg/Kg, i.p.

D.- Acido Cafeico (5 animales): Tres dosis de 150 mg/Kg, i.p.

La administración de los productos a ensayar se realizó a las 15.00 horas, en tres dosis sucesivas 48, 24 y 1 hora antes de la administración del CCl_4 . Esta se efectuó a las 16.00 horas.

Los animales permanecieron 18 horas en ayuno, con agua "ad libitum". Posteriormente se sacrificaron, procediendo a la determinación de las concentraciones hepáticas de glucógeno, GSH, triglicéridos y proteínas.

5.3.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XXVII, indicando aquellos casos en los que existe una diferencia significativa.

El tratamiento con el extracto de acetato de etilo, a la dosis de 2000 mg/Kg, potencia la toxicidad del CCl_4 . En primer lugar, de los 5 animales pertenecientes al grupo A, sólo 3 sobrevivieron a la intoxicación, lo que indica una acentuación de la letalidad del CCl_4 . Por otra parte, todos los parámetros estudiados, salvo el glucógeno, sufren un empeoramiento con respecto al grupo Intoxicado. Aunque esta modificación es únicamente significativa para el GSH, esto es debido a que sólo se han podido comparar los resultados provenientes de 3 animales, así como a la elevada dispersión observada.

		Intoxicado	Tratado A	Tratado B	Tratado C	Tratado D
PH/PC	n	6	4	3	5	5
	\bar{x}	3.87	4.27	4.41	3.73	3.41 ^b
	σ_{n-1}	±0.34	±0.39	±0.59	±0.23	±0.11
Proteína (mg/g)	n	6	4	3	5	5
	\bar{x}	188.77	192.73	179.90	210.35 ^a	216.98 ^b
	σ_{n-1}	±15.50	±26.21	±40.64	±14.64	±18.96
GSH (μ mol/100 mg proteína)	n	6	4	3	5	5
	\bar{x}	4.25	5.21	6.41 ^b	3.64 ^b	3.75 ^a
	σ_{n-1}	±0.39	±1.54	±1.97	±0.36	±0.33
Glucógeno (mg/100 mg proteína)	n	6	4	3	5	5
	\bar{x}	7.14	5.66	7.66	4.31	5.10
	σ_{n-1}	±4.07	±1.66	±2.78	±2.10	±2.87
Triglicéridos (mg/100 mg proteína)	n	6	-	-	5	5
	\bar{x}	25.79	-	-	16.55	18.24
	σ_{n-1}	±14.00	-	-	±4.15	±6.32
a.- Diferencia significativa para p<0.05 respecto al grupo Intoxicado						
b.- Diferencia significativa para p<0.01 respecto al grupo Intoxicado						

Tabla XXVII

La administración de 1000 mg/Kg de extracto de acetato de etilo, en tres dosis sucesivas, reduce las alteraciones con respecto al grupo Intoxicado (no existe diferencia significativa para ninguno de los parámetros estudiados). Sin embargo, en todos los casos, la comparación entre medias muestra una tendencia a la intensificación de los efectos tóxicos del CCl_4 (excepto en los valores de concentración proteica).

El ácido cafeico, administrado en forma preventiva, normaliza significativamente la relación PH/PC (Fig. XXXIII), la concentración hepática de proteínas (Fig. XXXIV) y los niveles de GSH (Fig. XXXV). Las concentraciones de glucógeno y triglicéridos presentan una tendencia a la recuperación, pero carecen de significación estadística.

En el tratamiento con cinarina se observa una mejora significativa en los niveles de proteína y GSH hepático (Fig. XXXIV y XXXV). Los otros parámetros presentan, igualmente, una disminución.

Estudios recientes (KOSHIHARA y col. 1984) demuestran una actividad del ácido cafeico como inhibidor de la lipooxigenasa, enzima implicado en la síntesis de los ácidos 12-hidroperoxiaraquidónico (HPETE) y 12-hidroxiaraquidónico (HETE). Se ha indicado que el HETE es quimiotáctico para los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos alveolares. Además, estos productos se han identificado en los exudados inflamatorios y parece ser que participan en los mecanismos de invasión celular durante la inflamación. Por ello, la inhibición de la lipooxigenasa puede dar como resultado una disminución del proceso inflamatorio de-

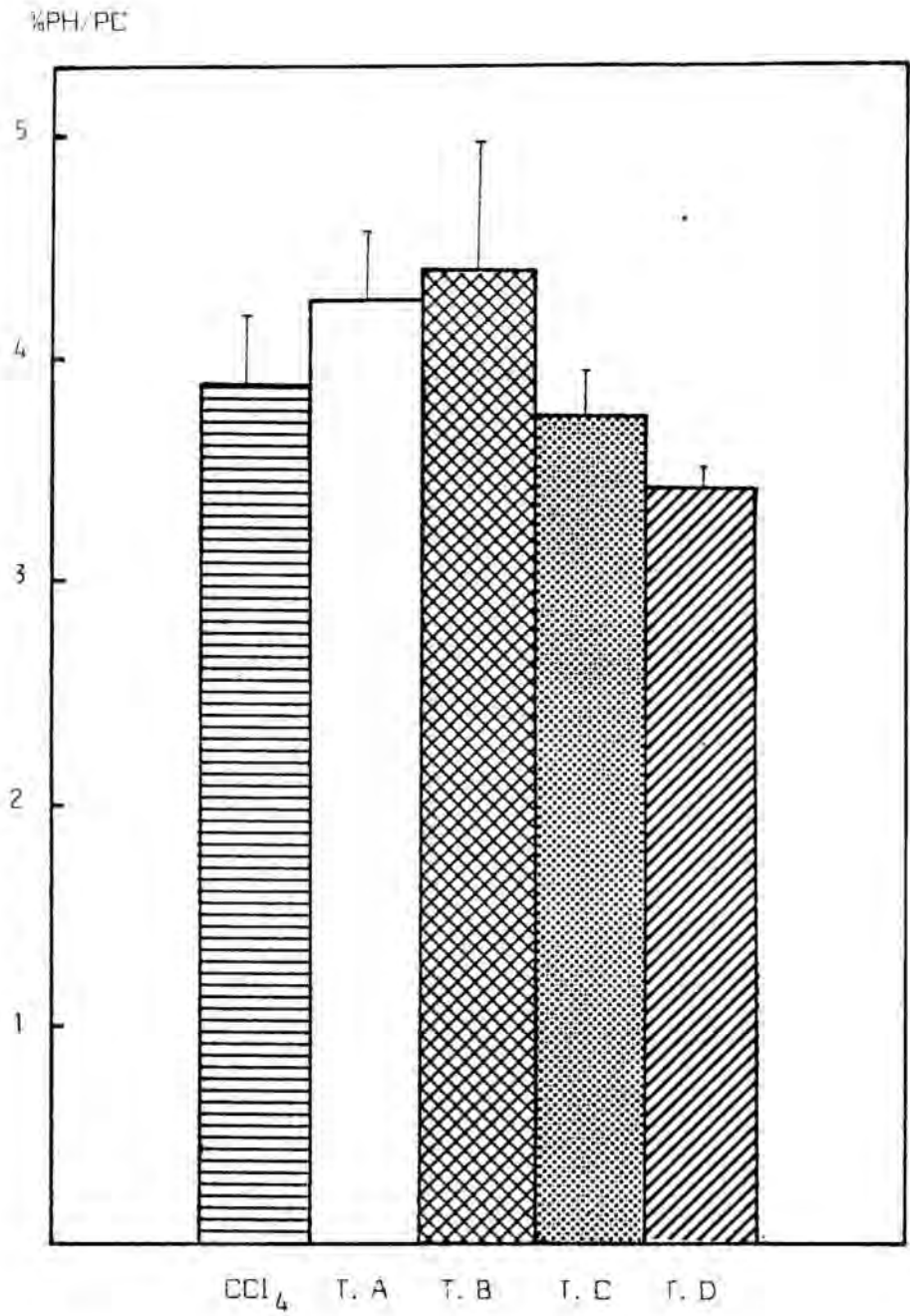


Figura XXXIII

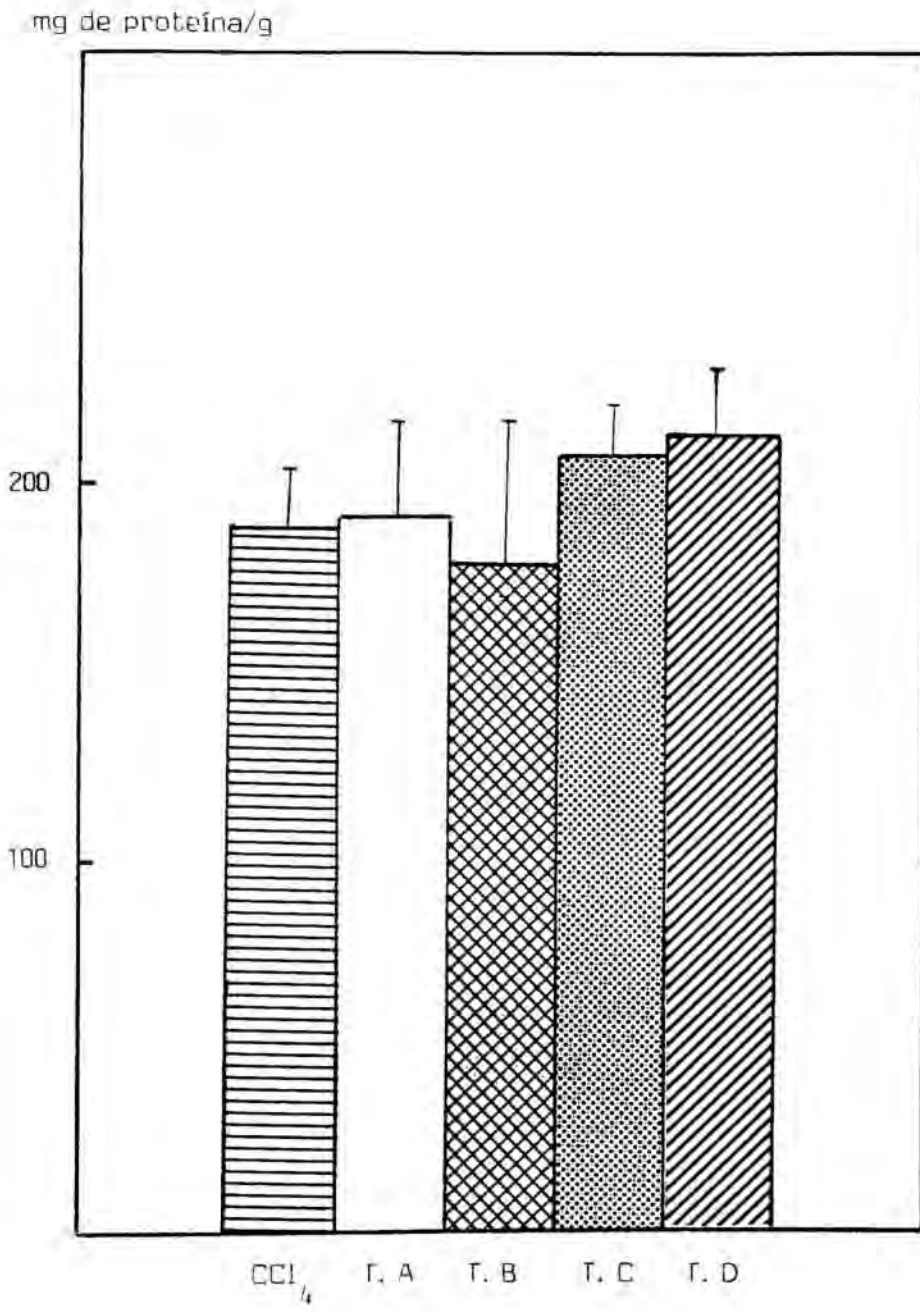


Figura XXXIV

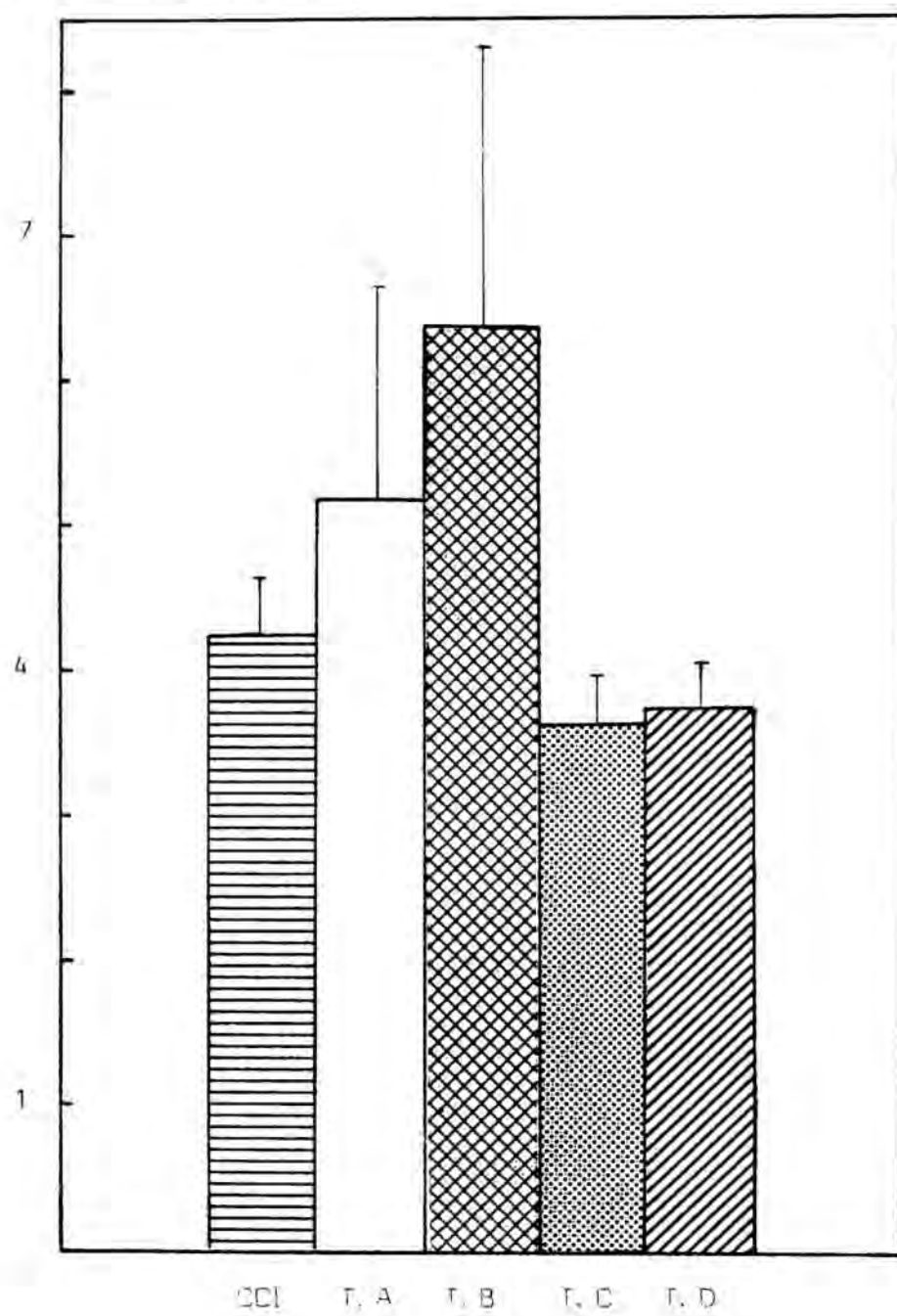
$\mu\text{mol GSH}/100 \text{ mg proteina}$ 

Figura XXXV

sencadenado por el CCl_4 .

El aumento en la concentración hepática de proteína sería consecuencia simultánea de la reducción en la inflamación, así como del descenso relativo en los depósitos de triglicéridos y glucógeno.

El ácido cafeico y sus derivados, al igual que los flavonoides, se comportan como antioxidantes naturales (KRAL y SONTAY 1982). YOUNES y SIEGERS (1981) demuestran una actividad protectora frente a la lipoperoxidación inducida por deplección del GSH para la quercetina, rutina y otros compuestos relacionados. En conjunto, parecería lógico suponer que los resultados observados se deben a una actuación a nivel de mecanismos oxidativos. El ácido cafeico y la cinarina sustituirían parcialmente al GSH como antioxidante celular. Esto comportaría una menor demanda del tripéptido, con lo que su síntesis se vería estimulada en menor grado, reduciéndose las tasas de GSH hepático. El efecto global sería una reducción en la lesión tisular, actuando ambos compuestos como agentes hepatoprotectores.

5.4.- ACCION DEL ACIDO CAFEICO Y CINARINA SOBRE LA LIPOPEROXIDACION INDUCIDA POR CCL_4

5.4.1.- Protocolo Experimental

Se utilizaron 15 ratas (210 ± 20 g), repartidas en los siguientes grupos de estudio:

Grupo Intoxicado (5 animales): Dosis de 2.5 ml/Kg de CCl_4 al 50% V/V en aceite de oliva, p.o.

Grupo tratado I (5 animales): Administración sucesiva de tres dosis de 200 mg/Kg de cinarina, i.p., 48, 24 y 1 hora antes de la intoxicación.

Grupo tratado II (5 animales): Administración sucesiva de tres dosis de 200 mg/Kg de ácido cafeico, i.p., 48, 24 y 1 hora antes de la intoxicación.

Los animales se mantuvieron en condiciones idénticas a las indicadas en el apartado 3.1.1. A las 24 horas postintoxicación se sacrificaron, cuantificándose el MDA hepático producido.

5.4.2.- Resultados y Discusión

En la tabla XXVIII se muestran los resultados obtenidos. Se puede apreciar que, tanto el ácido cafeico como la cinarina, normalizan los valores del porcentaje PH/PC (Fig. XXXVI). El aumento en la dosis de cinarina (200 mg/Kg respecto a 150 mg/Kg utilizados en el estudio precedente) sería el responsable de la producción de este efecto.

El tratamiento con ácido cafeico y cinarina no es capaz de disminuir significativamente los niveles de MDA. La dispersión encontrada en estos resultados es elevada, lo cual puede enmascarar la posible inhibición de la peroxidación lipídica por estos compuestos.

El hecho de que el cociente PH/PC se vea disminuido indica una acción beneficiosa evidente. La valoración de la lipoperoxidación se efectúa sobre homogenados tisulares totales. Esto ha permitido evidenciar diferencias entre los grupos Con-

		Intoxicado	Tratado I	Tratado II
PH/PC	n	5	5	5
	\bar{x}	4.51	3.74 ^a	3.92 ^b
	n-1	±0.40	±0.37	±0.48
MDA (nmol/g)	n	5	5	5
	\bar{x}	2073.66	1914.24	1580.32
	n-1	±569.75	±895.01	±756.69
a.- Diferencia significativa para $p < 0.01$ con respecto al grupo Intoxicado b.- Diferencia significativa para $p < 0.05$ con respecto al grupo Intoxicado				

Tabla XXVIII

trol e Intoxicado, basadas en la evaluación del proceso en el conjunto de lípidos hepáticos. Como consecuencia, la dispersión de resultados obtenida ha sido elevada, manifestándose incluso una gran variación dentro de los grupos Intoxicados valorados. Por ello, podría ser objeto de posteriores estudios la cuantificación de la lipoperoxidación en fracciones subcelulares aisladas (microsomas, etc.), atacadas directamente por el CCl_4 , de forma que se facilitara la detección de diferencias entre los grupos tratados.

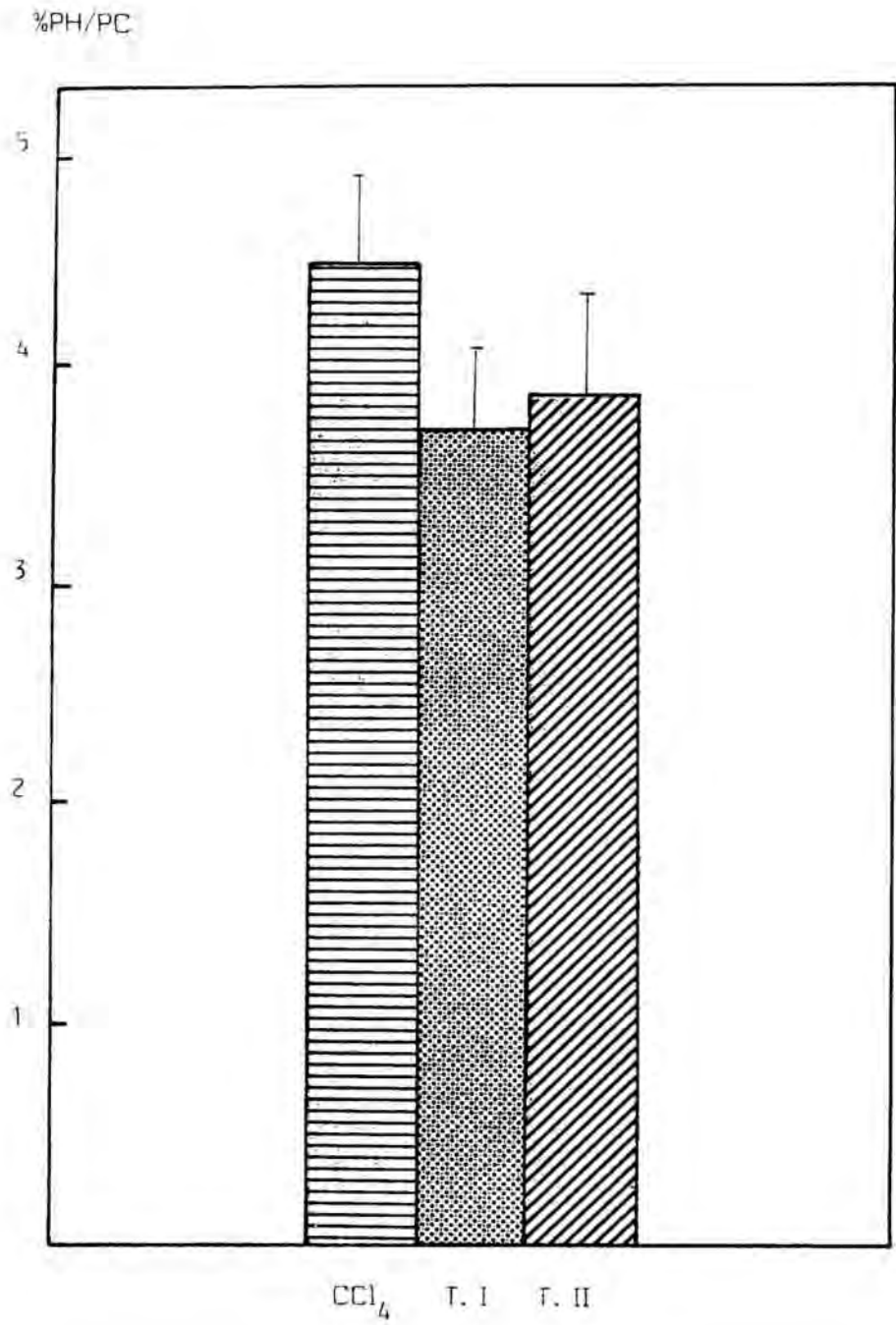


Figura XXXVI

Capítulo V.

Acción Farmacológica de
derivados polifenólicos
en hepatocitos aislados

1.- INTRODUCCION

Es difícil evidenciar un efecto hepatoprotector en los estudios realizados en animal entero. Ello radica no sólo en la extrema complejidad funcional del hígado, sino en la enorme magnitud de variables, dependientes del conjunto orgánico del animal, que son capaces de modificar los resultados farmacológicos. Por otra parte, un factor accesorio, pero no por ello menos importante, radica en conseguir la suficiente cantidad de principios (ya sea en estado puro, o en forma de extracto vegetal) para su administración al animal de experimentación.

Se planteó la búsqueda de un protocolo experimental que, sin utilizar técnicas "in vivo", cumpliera dos requisitos indispensables:

- # Reproducción e identidad de las manifestaciones hepatotóxicas del CCl_4 detectadas "in vivo".

- # Utilización de mínimas cantidades del compuesto hepatoprotector, posibilitando la realización de ensayos dosis-respuesta.

La utilización de hepatocitos aislados cumple estos requisitos. Como ventajas esenciales, se pueden destacar (VAN DE WERVE 1980, LE BIGOT y col. 1981):

- # Utilización de poblaciones celulares homogéneas.

- # Mantenimiento de la capacidad funcional del hepatocito, sin eliminar vías metabólicas primordiales, como en el caso de la utilización de fracciones subcelulares (ZIEGLER y col. 1982).

Correlación adecuada entre las manifestaciones tóxicas que se producen en el hepatocito aislado y las detectadas "in vivo", corroborado por estudios realizados con cadmio (SANTONE y col. 1982, STACEY y KAPPUS 1982), clorpromacina (TSAO y col. 1982), aflatoxinas (BAILEY y col. 1982, GREEN y col. 1982), selenito (ANUNDI y col. 1982), acetaldehído (STEGE 1982) y otros hepatotóxicos.

Sustancias tales como la silimarina y el cianidanol, cuya acción hepatoprotectora se ha podido demostrar "in vivo", manifiestan también esta acción en ensayos realizados con esta técnica (RAMELLINI y MELDOLESI 1976, SOMENBICHLER y col. 1976, PERRISSOUD y col. 1981).

La toxicidad del CCl_4 en preparaciones de hepatocitos aislados ha sido estudiada por numerosos autores (STACEY y col. 1982, PENCIL y col. 1982, SCHWERTZ y LAMB 1982, WEDDLE y col. 1976, RUITER y col. 1982, PENCIL y col. 1982), encontrándose un paralelismo con las lesiones inducidas "in vivo". Sin embargo, las dosis de CCl_4 aplicadas hacen muy problemática la reversibilidad del daño celular mediante un agente hepatoprotector. Gracias al trabajo de PERRISSOUD y col. (1981), en el que se demuestran efectos tóxicos a dosis fisiológicas, se ha podido soslayar este problema.

2.- MATERIAL Y METODOS. OBTENCION DE HEPATOCITOS AISLADOS

La obtención de hepatocitos aislados se consigue mediante la técnica de perfusión con colagenasa, propuesta por HOWARD

(SEGLEN 1976) y modificada posteriormente por BERRY y FRIEND (1969). Consta de los siguientes pasos:

Remoción del Ca^{++} extracelular hepático, responsable de la adhesión de los hepatocitos en las placas desmosómicas.

El animal de experimentación se anestesia con pentobarbital sódico (200 mg/Kg, i.p.). Se incide la cavidad abdominal y se visualiza la vena porta. Desprendidas las adherencias grasas, se canula con un catéter de material plástico (1 mm \varnothing interno), fijándolo convenientemente.

La perfusión del hígado se realiza con ayuda de una bomba peristáltica (Gilson, Minipuls II). El líquido de perfusión es tampón Krebs-Ringer-bicarbonato (NaCl 118.5 mM, KCl 4.8 mM, NaHCO_3 25 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2 mM y glucosa 1500 mg/l), oxigenado con carbógeno (a fin de mantener un pH 7.4) y termotatado a 37 °C. Entre la cánula y la bomba de perfusión se coloca un dispositivo que evite la entrada de burbujas y partículas en suspensión al parénquima hepático.

La perfusión se prolonga durante 10 minutos, a razón de 20 ml/minuto, a fin de eliminar totalmente el Ca^{++} extracelular y los restos hemáticos.

Digestión enzimática del tejido conectivo

Finalizada la perfusión, se escinde el hígado y se deposi

ta en un soporte poroso, colocado sobre el recipiente que contiene el líquido de perfusión, estableciéndose, de esta manera, un circuito cerrado (ver figura XXXVII).

En el momento en que se extrae el hígado es conveniente dejar una porción de vena cava, para facilitar la salida del líquido de perfusión. Asimismo, es necesario realizar el proceso con sumo cuidado, evitando desgarrar la cápsula de Glisson, lo que conllevaría a una perfusión defectuosa.

Se ha de calcular el volumen de tampón de forma que, al cerrar el circuito, éste sea de 90 ml. A continuación, se añaden 10 ml de una solución que contiene albúmina bovina (fracción V, Sigma), colagenasa (tipo I de *Clostridium histolyticum*, Worthington) y CaCl_2 , de forma que la concentración final en el líquido de perfusión sea, respectivamente, de 15 mg/ml, 0.4 mg/ml y 2.5 mM. El flujo se incrementa a 30-35 ml/minuto, manteniéndolo entre 12-20 minutos. Durante este período de tiempo, el hígado se recubre con un vidrio de reloj, a fin de mantener una película líquida sobre el órgano y evitar su desecación.

Disgregación

Una vez acabada la digestión enzimática, se transfiere el hígado a una cápsula de Petri que contiene 50 ml de tampón con CaCl_2 (2.5 mM) y albúmina bovina (15 mg/ml), previamente oxigenado. Mediante unas pinzas, se elimina la cápsula de Glisson y, por agitación suave, se obtiene la suspensión de hepatocitos.

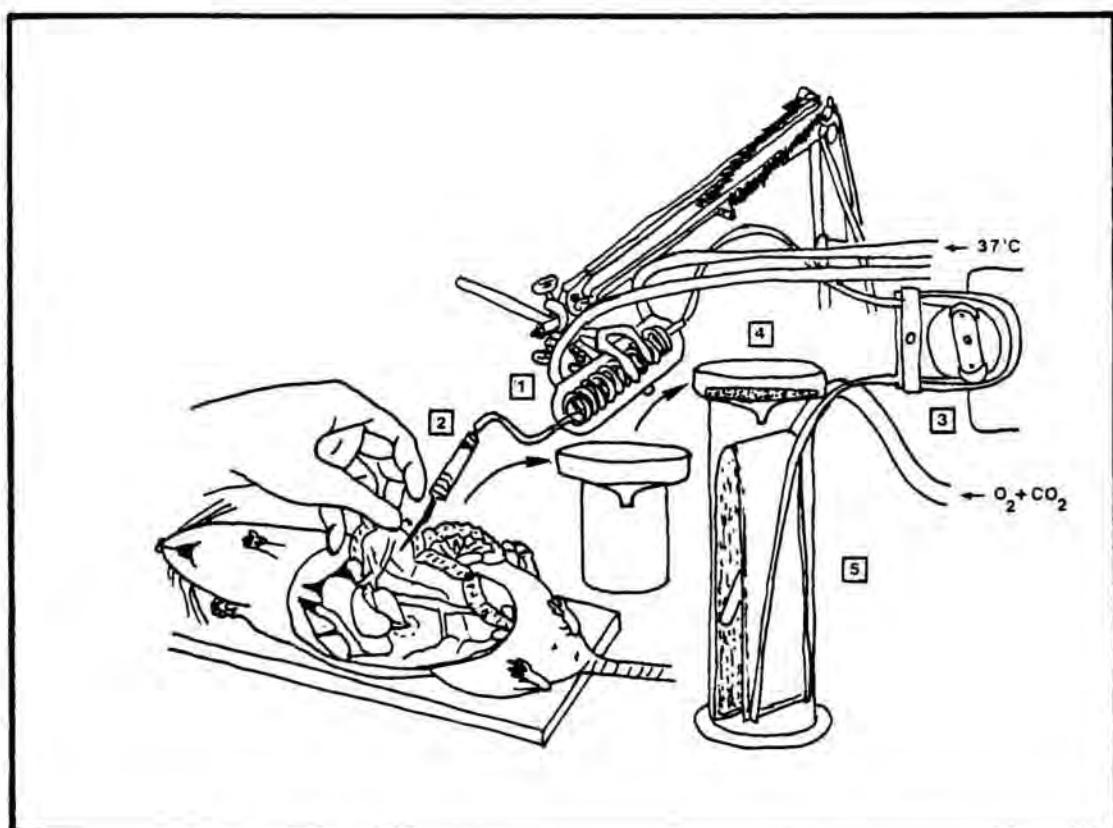


Fig. XXXVII. [1] Calefactor, [2] Filtro, [3] Bomba peristáltica, [4] soporte poroso, [5] Cilindro de oxigenación y reservorio.

Purificación

Para eliminar los restos tisulares no disgregados, la suspensión se filtra por una malla de nylon de 150 μm , sobre un erlenmeyer. A continuación se realiza, durante 15 minutos, una preincubación a 37 °C, con agitación suave (40 ciclos/minuto) y oxigenación continua.

Se filtra de nuevo la suspensión por una malla de 50 μm , con lo que quedan retenidas las células no parenquimatosas. El filtrado se centrifuga a 50 x g, 90 segundos, eliminando el sobrenadante. El "pellet" se resuspende en un volumen apropiado de tampón oxigenado, repitiendo el proceso dos veces.

El "pellet" final se resuspende en el volumen de tampón (con CaCl_2 2.5 mM) necesario para obtener una dilución 1/12 de su peso (aproximadamente, $10 \cdot 10^6$ células/ml). La suspensión se distribuye en viales de 10 ml, a razón de 1.5 ml/vial, colocados en un baño termostatado a 37 °C (Selecta, Unitronic 320-OR) y se mantiene en agitación mecánica (65-70 ciclos/minuto) y oxigenada con carbógeno.

La viabilidad de la preparación celular se determina por el test de exclusión del azul tripano (HOWARD y PESCH 1968). Se desecharon aquellas suspensiones en las que el índice de viabilidad fue inferior al 85%.

3.- PROTOCOLO EXPERIMENTAL. ELECCION DE LAS CONDICIONES DE EXPERIMENTACION

Esta primera parte del estudio se basó en la necesidad de

determinar tres parámetros esenciales para la prosecución del mismo:

- # Estado nutricional del animal.
- # Dosis óptima de CCl_4 .
- # Tiempo óptimo de incubación.

Se han utilizado ratas Sprague-Dawley ♂ (220 ± 20 g), mantenidas en ayuno, en su caso, 18-24 horas antes de la realización de la experiencia. Esta se efectuó siempre durante la mañana, entre las 10.00-12.00 horas, para evitar la influencia de los ritmos circadianos.

El protocolo adoptado fue el siguiente:

La suspensión celular, una vez introducida en los viales de incubación, se dejaba estabilizar durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se administraba un volumen de $10 \mu\text{l}$ de dimetil sulfóxido (DMSO, Merck), en el que se encontraba disuelto el CCl_4 . Los viales que servían de control recibían el mismo volumen de DMSO. Durante todo el proceso se realizaba una oxigenación conveniente.

Finalizado el tiempo de incubación, se tomaba de cada vial dos alícuotas de 0.5 ml. una de ellas se centrifugaba inmediatamente ($3000 \times g$, 20 segundos). En el sobrenadante se valoraban los niveles de AST y ALT liberados por los hepatocitos. La alícuota restante se sometía a un proceso de homogenización (Polytron, Kinematica), durante 20-30 segundos. El homogenado se utilizaba para valorar el contenido total en AST y ALT de la suspensión celular. Desde su obtención hasta el momento de la valoración, las muestras permanecían en un baño de hielo.

El análisis enzimático se realizó, previa dilución 1/10 con tampón, en un autoanalizador centrífugo Cobas-Bio (Roche), por métodos ya descritos en esta memoria (apartado 3.2., Capítulo III). Todas las valoraciones se realizaron por duplicado.

La relación:

$$\frac{\text{Concentración enzimática liberada}}{\text{Concentración enzimática total}} \times 100$$

proporciona el porcentaje de liberación enzimática en el medio, indicativo del grado de lesión celular.

3.1.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION EN LA EVOLUCION DEL FENOMENO TOXICO. ELECCION DE LA DOSIS DE CCl₄

En esta primera experiencia se utilizó una dosis de CCl₄ de 0.2 µl/ml de medio. Se emplearon hepatocitos procedentes de ratas alimentadas. Los tiempos de incubación fueron: 5, 10, 15, 20 y 30 minutos a partir del momento de la adición del tóxico.

Los resultados se muestran en la tabla XXIX. Todos los valores del grupo Intoxicado presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo Control.

Las figuras XXXVIII-XXXIX representan gráficamente la evolución en el tiempo del porcentaje de liberación enzimática (%LE). Se puede observar, como hecho más destacable, la inversión de sensibilidad de los dos enzimas. Mientras que en condi

	AST					ALT						
	Control			Intoxicado		Control			Intoxicado			
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
5'	4	6.7	± 0.9	6	12.9	± 3.4	3	9.7	± 0.9	7	14.1	± 3.5
10'	-	-	-	6	12.2	± 2.3	-	-	-	6	14.0	± 3.1
15'	4	6.5	± 1.8	4	16.7*	± 1.3	4	9.2	± 1.2	4	15.9	± 2.1
20'	-	-	-	3	20.8	± 4.9	-	-	-	3	15.9	± 1.3
30'	4	6.9	± 1.0	6	18.4	± 3.7	4	9.6	± 2.4	5	15.9	± 0.8
* Diferencia significativa (p 0.01) entre tiempos consecutivos												

Tabla XXIX

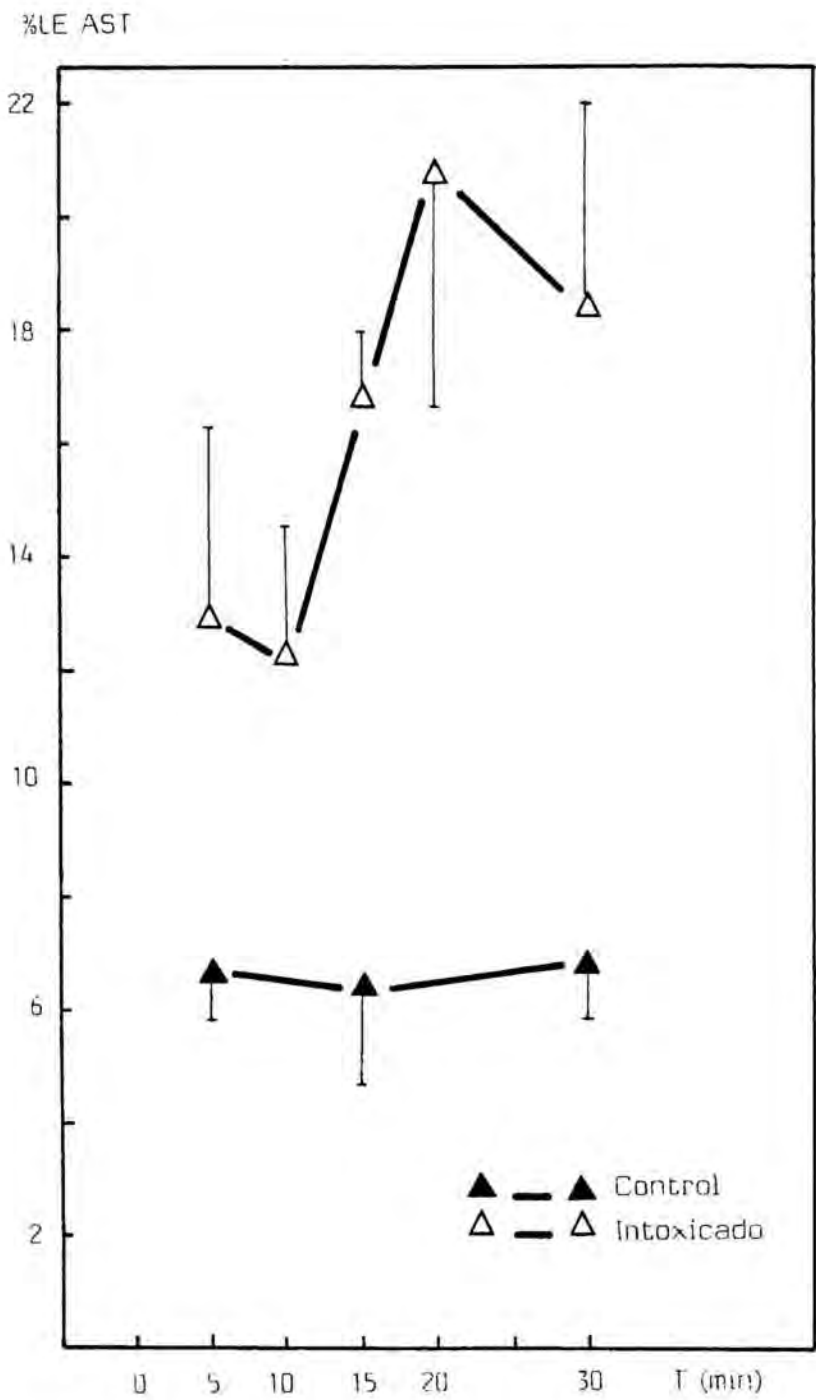


Figura XXXVIII

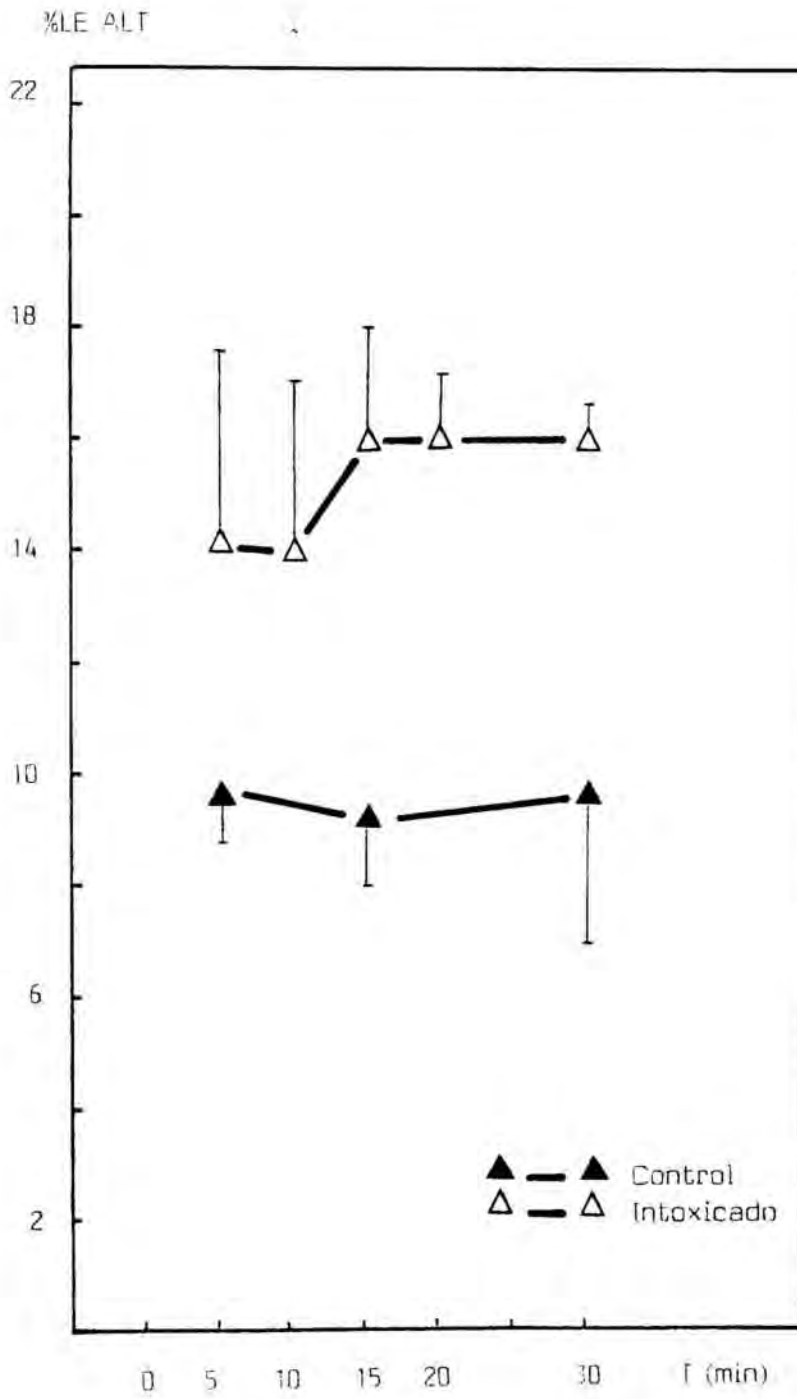


Figura XXXIX

ciones basales (sin CCl_4) la ALT presenta un %LE superior, aproximadamente, en 3 unidades al de la AST, la introducción del tóxico invierte este fenómeno, liberándose mayor cantidad de AST en respuesta a la agresión del CCl_4 . Este patrón enzimático se corresponde plenamente al que aparece en las experiencias "in vivo". Asimismo, durante el tiempo de incubación, se mantiene la viabilidad de los hepatocitos, como lo demuestra el hecho de que el %LE (para AST y ALT) sea constante a lo largo del tiempo en el grupo Control.

Por otra parte, la evolución temporal de la AST presenta dos fases diferenciadas, una hasta los 10 minutos de incubación y otra a partir de los 15 minutos de la misma. En el período comprendido entre estos dos tiempos se produce un incremento en el %LE. Los resultados obtenidos para la ALT no manifiestan diferencias a lo largo de la incubación.

A continuación, se realizó una experiencia idéntica, pero utilizando una dosis de $0.15 \mu\text{l CCl}_4/\text{ml}$ de medio. Los tiempos de incubación fueron: 10, 15, 20 y 30 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla XXX. Todos los valores del grupo intoxicado presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo Control.

Como se aprecia en las figuras XL y XLI, en este caso la intoxicación con CCl_4 no evoluciona con el tiempo, permaneciendo prácticamente constantes los niveles enzimáticos (tanto AST como ALT) en el transcurso de la incubación. En la tabla XXXI se compara la liberación enzimática producida a cada tiempo para las dos dosis de CCl_4 (0.2 y $0.15 \mu\text{l/ml}$).

	AST				ALT				
	Control		Intoxicado		Control		Intoxicado		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
10'	-	-	-	5	17.4	± 4.4	-	-	-
15'	4	7.5	± 0.7	5	16.6	± 1.7	4	9.6	± 1.9
20'	-	-	-	6	16.0	± 2.6	-	-	-
30'	4	7.1	± 0.8	7	16.9	± 4.1	3	8.6	± 1.5
							5	17.5	± 3.1
							5	15.6	± 2.4
							6	13.4	± 2.3
							7	15.3	± 2.6

Tabla XXX

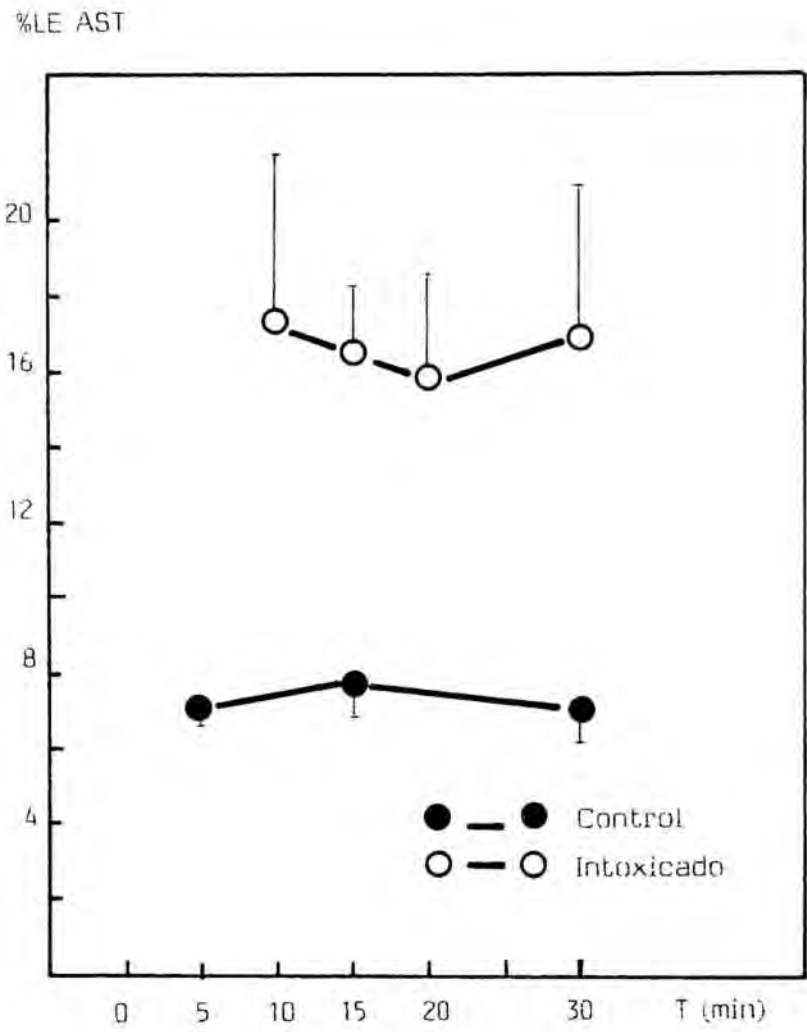


Figura XL

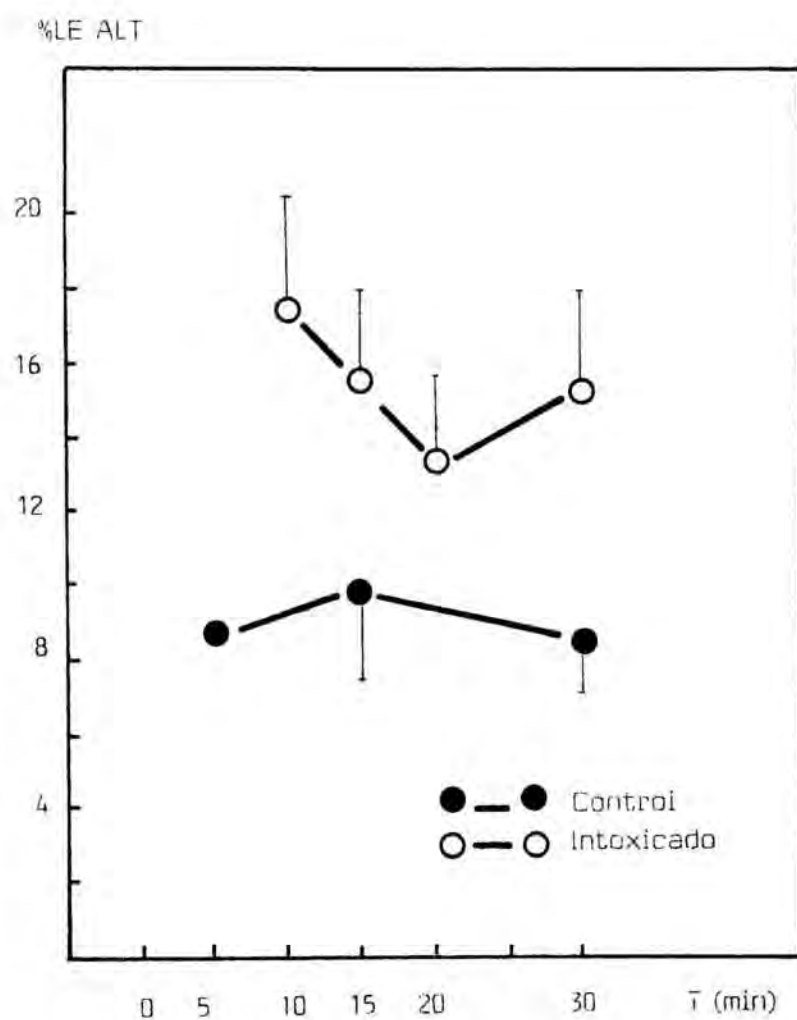


Figura XL1

	AST		ALT	
	0.2 $\mu\text{l/ml}$	0.15 $\mu\text{l/ml}$	0.2 $\mu\text{l/ml}$	0.15 $\mu\text{l/ml}$
10'	12.2%	17.4% *	14.0%	17.5% *
15'	16.7%	16.6%	15.9%	15.6%
20'	20.8%	16.0%	15.9%	13.4%
30'	18.4%	16.9%	15.9%	15.3%
* Diferencia significativa para $p < 0.05$				

Tabla XXXI

Unicamente existe una diferencia estadísticamente significativa a los 10 minutos de incubación, tiempo en el que, paradójicamente, la dosis de 0.15 $\mu\text{l CCl}_4/\text{ml}$ produce unos niveles de liberación enzimática superiores a los inducidos por la dosis de 0.2 $\mu\text{l CCl}_4/\text{ml}$.

Posteriormente, se estudió el efecto de dos dosis más de CCl_4 , 0.1 y 0.05 $\mu\text{l/ml}$ de medio, a los 20 minutos de incubación. La tabla XXXII muestra los resultados obtenidos.

En este caso, el CCl_4 sólo eleva significativamente, con respecto al grupo Control, el %LE para la AST, manteniéndose i nalterados los valores de la ALT. Por tanto, estas dosis no son utilizables en el presente estudio.

En las figuras XLII y XLIII se representan conjuntamente los niveles de liberación enzimática a los 20 minutos de incu-

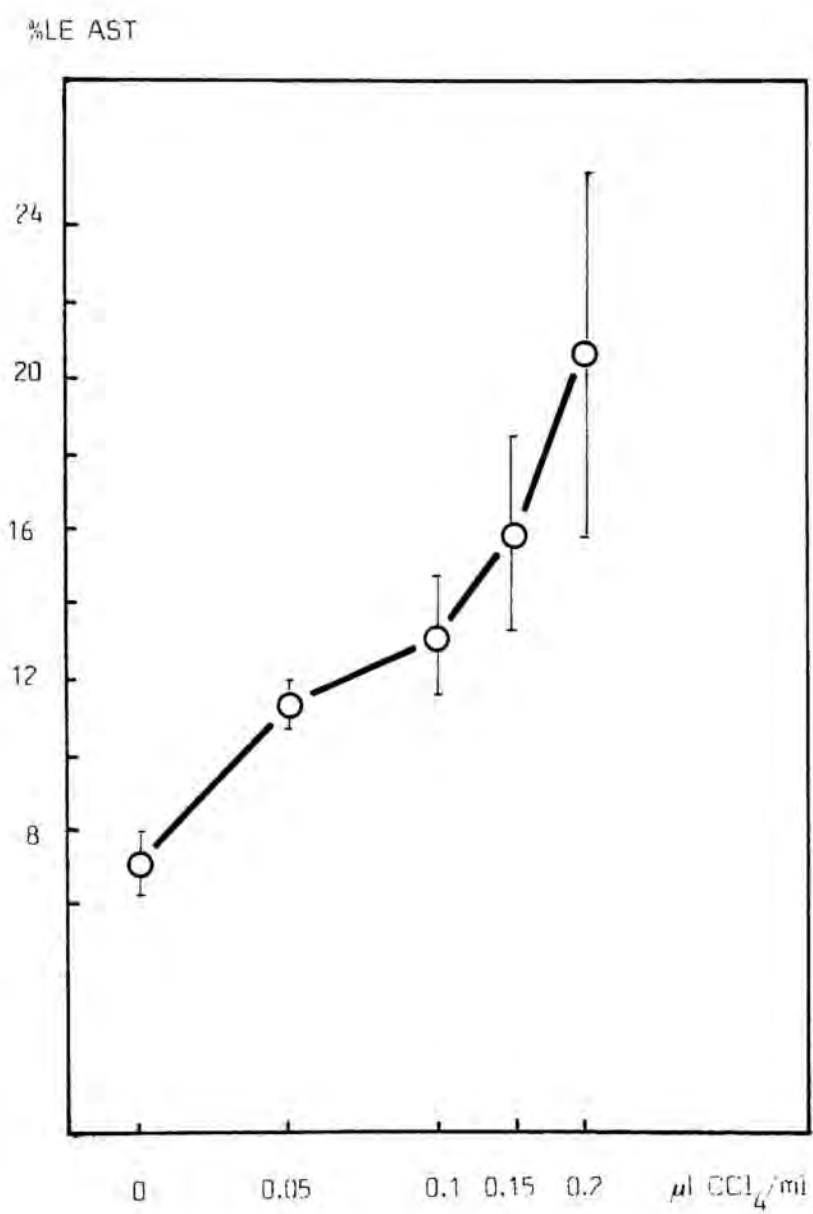


Figura XLII

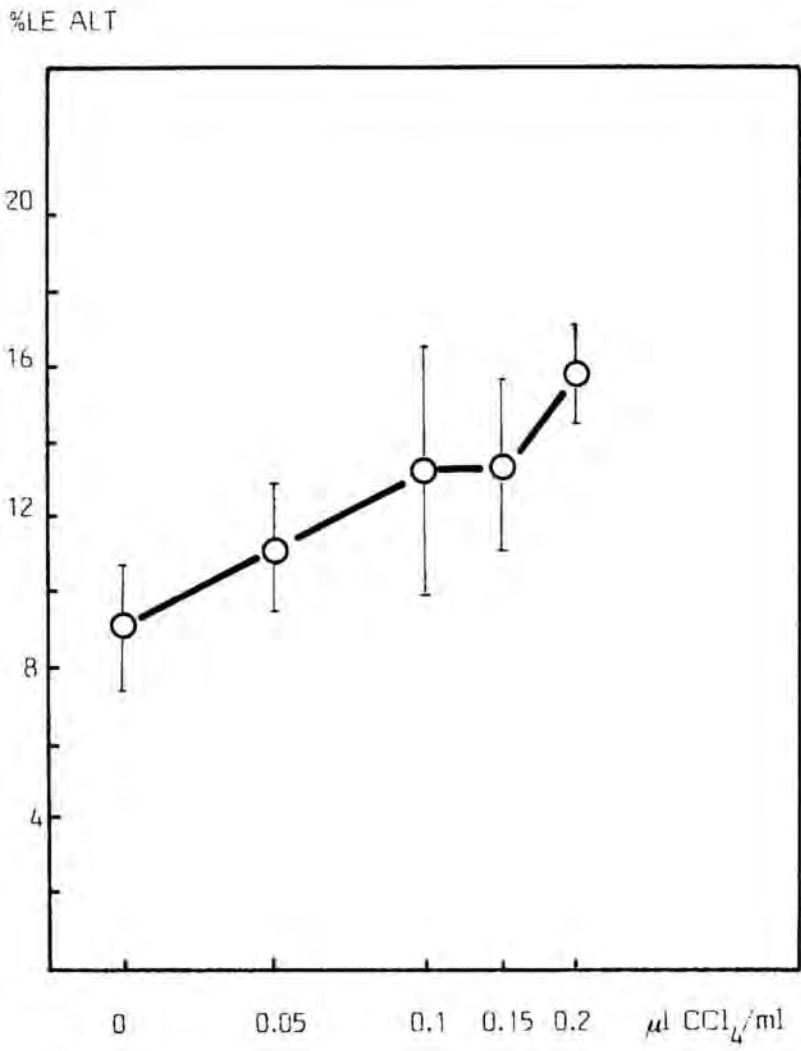


Figura XLIII

		AST			ALT		
		n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control		4	7.7	± 0.7	3	7.8	± 0.8
CCl ₄	0.1 μ l/ml	4	13.2*	± 1.6	4	13.3	± 3.3
	0.05 μ l/ml	4	11.4*	± 0.6	3	11.2	± 1.7
* Diferencia significativa para $p < 0.05$ con respecto al grupo Control							

Tabla XXXII

bación, para todas las dosis de CCl₄ ensayadas. Se puede observar que, tanto la administración de 0.15-0.2 μ l de CCl₄/ml, produce un daño celular manifiesto. Sin embargo, el hecho de que la dosis de 0.15 μ l/ml no presente una evolución temporal puede dificultar su aplicación en el estudio de compuestos hepatoprotectores. Por ello, se escogió como óptima la dosis de 0.2 μ l de CCl₄/ml para la continuación de los ensayos.

3.2.- INFLUENCIA DEL ESTADO NUTRICIONAL DEL ANIMAL DE EXPERIMENTACION

Para delimitar este factor se realizó un estudio idénti-

co al anterior, con la dosis de $0.2 \mu\text{l CCl}_4/\text{ml}$, en suspensiones de hepatocitos procedentes de animales en ayuno.

La tabla XXXIII muestra los resultados obtenidos. Todos los valores del grupo intoxicado presentan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al grupo Control.

En las figuras XLIV y XLV se representan gráficamente estos resultados. Se puede observar que la AST, a diferencia del comportamiento detectado en preparaciones procedentes de ratas alimentadas, posee dos puntos de inflexión, entre los 10-15 minutos y los 20-30 minutos, respectivamente. De igual forma, la ALT presenta un punto de inflexión (entre los 10-15 minutos), no detectable en los estudios realizados a partir de animales no sometidos a ayuno. Asimismo, estos datos corroboran la diferente sensibilidad de los dos enzimas valorados, demostrada en los ensayos precedentes, frente a la acción tóxica del CCl_4 .

La comparación de los resultados conseguidos a partir de ambos tipos de preparaciones se muestra en la tabla XXXIV. En general, se puede afirmar que, en los estudios efectuados con animales alimentados, se consiguen más rápidamente los niveles máximos de liberación enzimática. Sin embargo, a los 30 minutos de incubación se alcanzan, en cualquier caso, idénticas concentraciones, tanto para la AST como para la ALT. Teniendo en cuenta que es mucho más dificultoso obtener preparaciones de hepatocitos viables a partir de animales alimentados, se decidió fijar las siguientes condiciones para la realización de

	AST				ALT							
	Control		Intoxicado		Control		Intoxicado					
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}			
5'	3	7.0	± 1.0	6	13.2	± 0.9	2	10.8	± 2.1	4	13.2	± 1.1
10'	-	-	-	6	12.2	± 2.1	-	-	-	4	12.3	± 0.2
15'	3	6.7	± 1.1	6	14.3*	± 1.1	2	9.4	± 1.6	4	13.7*	± 0.8
20'	-	-	-	4	15.5	± 1.2	-	-	-	4	13.2	± 1.5
30'	3	6.2	± 0.2	4	18.7*	± 2.9	3	9.6	± 0.7	4	14.3	± 2.0
* Diferencia significativa para p<0.01 entre tiempos consecutivos												

Tabla XXXIII

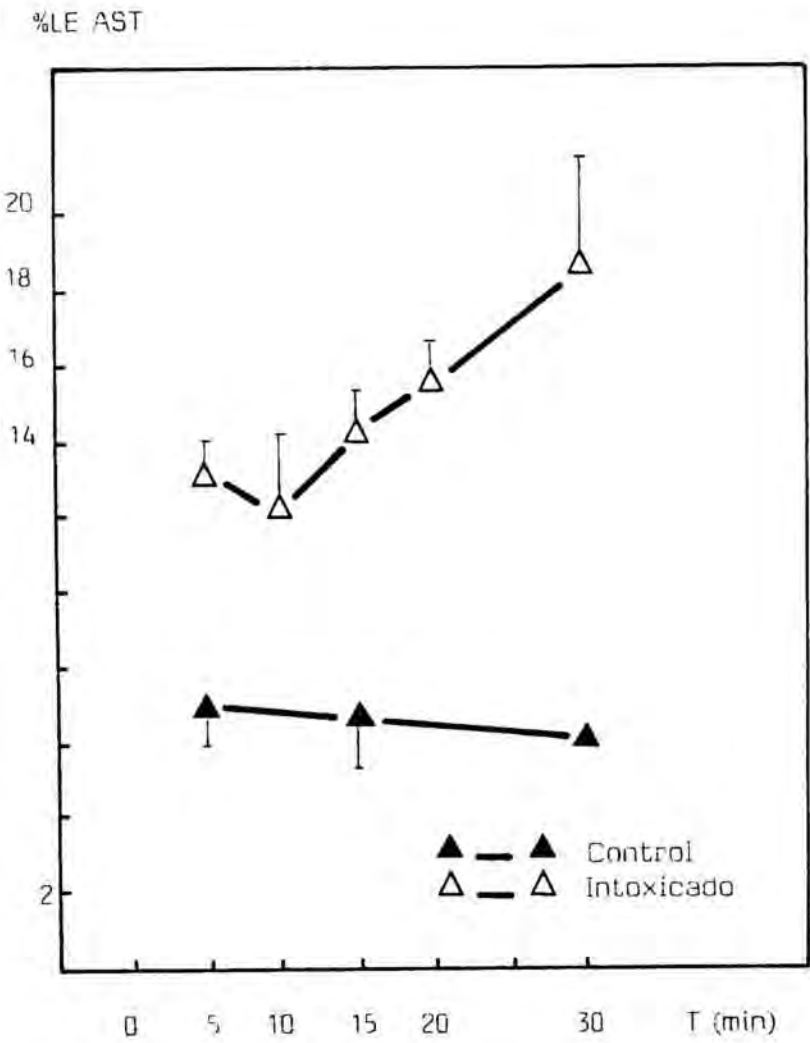


Figura XLIV

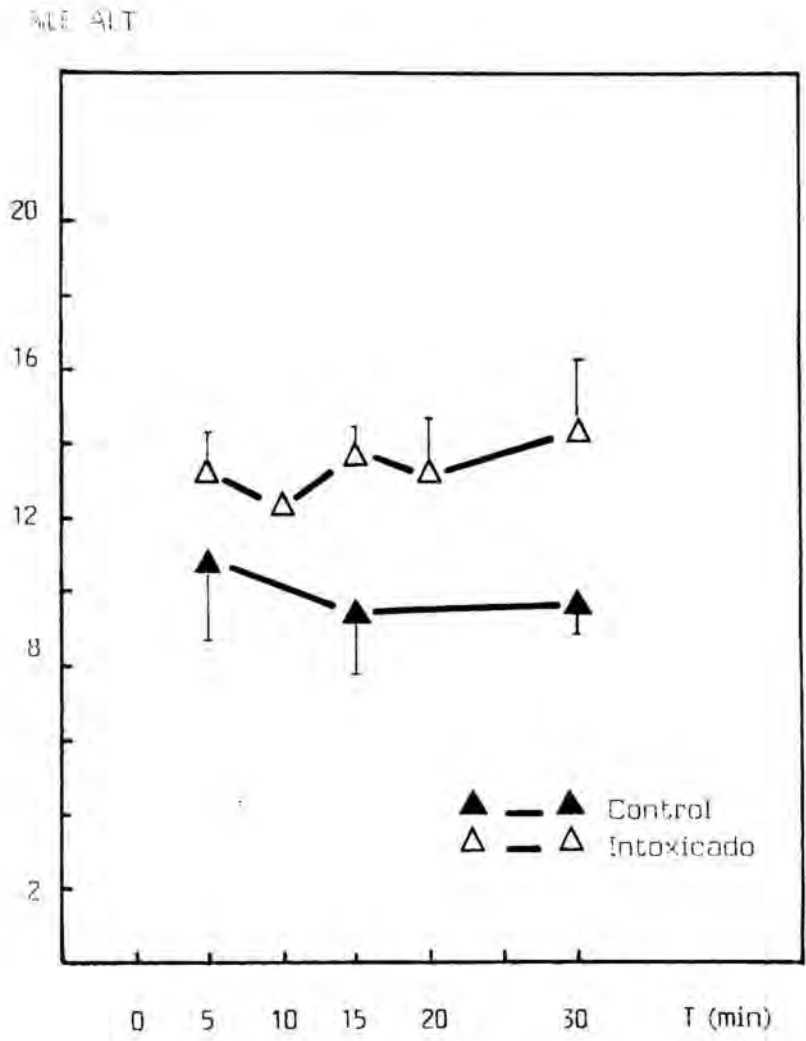


Figura XLV

los estudios posteriores:

Aislamiento de hepatocitos a partir de animales en ayuno.

Dosis de 0.2 μ l de CC₄/ml medio de incubación.

Tiempo de incubación de 30 minutos.

	AST		ALT	
	Alimentado	Ayuno	Alimentado	Ayuno
5'	12.9%	13.2%	14.1%	13.2%
10'	12.2%	12.2%	14.0%	12.3%
15'	16.7% *	14.3%	15.9%	13.7%
20'	20.8%	15.5%	15.9% *	13.2%
30'	18.4%	18.7%	15.9%	14.3%
* Diferencia significativa para p<0.05 respecto al grupo ayuno				

Tabla XXXIV

4.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD HEPATOPROTECTORA DE COMPUESTOS POLIFENOLICOS

4.1.- SUSTANCIAS VALORADAS. CONDICIONES DE ENSAYO

Se estudió la actividad hepatoprotectora de las siguientes sustancias:

(+)- 3 - Cianidanol (proporcionado por Lab. Zyma,

Suiza), como sustancia control cuya actividad hepatoprotectora ha sido demostrada en experiencias similares.

Acido Cafeico, Acido Isoclorogénico, 7-glucosil luteolina (Sarsyntex), Acido Quínico (Fluka), Acido Clorogénico (Sigma) y Cinarina (proporcionada por Lab. Ferrer), constituyentes polifenólicos de Cynara scolymus L.

Extracto de Acetato de Etilo de Cynara scolymus L.

Todas las sustancias, a excepción del ác. Isoclorogénico, se ensayaron a 4 concentraciones diferentes: 0.01/0.1/1 y 3 mg/ml. Se solubilizaron en DMSO, vehiculizándose en un volumen de 10 μ l por vial de incubación.

15 minutos después de depositar la suspensión celular, se administraba la sustancia a ensayar. Los viales Control e Intoxicados recibían el mismo volumen de DMSO. Al cabo de 10 minutos, se procedía a realizar la intoxicación, suministrando idéntico volumen de disolvente a los viales Control. Transcurridos 30 minutos de incubación, se procedía a la determinación del porcentaje de liberación enzimática.

4.2.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos se indican en las tablas XXXV (Cianidanol), XXXVI (Ac. Cafeico), XXXVII (Ac. Quínico), XXXVIII (Ac. Clorogénico), XXXIX (Ac. Isoclorogénico), XL (Cinarina), XLI (7-glucosil luteolina) y XLII (Extracto de acetato de etilo). En todas ellas, se señalan aquellos casos en que existe una diferencia significativa entre los grupos trata

Tabla XXXVI: Cianidanol

	AST			ALT		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	5	12.9	± 2.3	5	12.5	± 2.2
CCl ₄	6	21.2	± 1.9	6	17.2	± 2.7
0.01 mg/ml	6	16.8 *	± 2.1	13.5	13.5 *	± 2.3
0.1 mg/ml	6	18.3 *	± 2.1	6	14.3 *	± 0.9
1 mg/ml	6	21.0	± 1.3	6	17.3	± 2.3
3 mg/ml	6	22.4	± 2.5	6	20.1	± 4.9
* Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al CCl ₄						

	AST			ALT		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	6	13.2	± 2.1	6	13.6	± 2.2
CCl ₄	6	24.0	± 2.8	6	20.5	± 2.4
0.01 mg/ml	5	21.0 **	± 2.0	5	19.0	± 2.7
0.1 mg/ml	6	19.9 **	± 4.8	6	17.5	± 6.3
1 mg/ml	6	18.6 *	± 3.6	6	13.4 *	± 2.7
3 mg/ml	6	22.1	± 3.2	6	16.7 **	± 4.8
* Diferencia significativa para $p < 0.01$ respecto al CCl ₄						
** Diferencia significativa para $p < 0.05$ respecto al CCl ₄						

Tabla XXXVII: Ac. Cafeico

Tabla XXXVII: Ac. Quínico

	AST			ALT		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	5	12.0	± 2.1	6	12.3	± 2.8
CCl ₄	6	23.7	± 4.6	6	19.3	± 3.7
0.01 mg/ml	6	18.4**	± 3.0	6	15.5**	± 2.7
0.1 mg/ml	6	21.9	± 2.5	6	18.1	± 1.6
1 mg/ml	6	21.2	± 2.4	6	17.4	± 2.0
3 mg/ml	6	21.2	± 2.8	6	17.0	± 1.9
** Diferencia significativa para $p < 0.05$ respecto al CCl ₄						

	AST			ALT		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	6	11.8	± 2.3	6	11.5	± 3.2
CCl ₄	6	21.6	± 4.3	6	18.1	± 3.0
0.01 mg/ml	6	19.5	± 3.5	6	16.7	± 3.6
0.1 mg/ml	6	19.4	± 3.7	6	15.3	± 3.9
1 mg/ml	5	20.6	± 3.9	5	17.7	± 4.0
3 mg/ml	6	20.6	± 2.7	6	15.9	± 3.0

Tabla XXXVIII: Ac. Clorogénico

dos y el Intoxicado. Todos los valores de este último grupo difieren significativamente ($p < 0.01$) con respecto a los obtenidos en el grupo Control, por lo que se omite su especificación.

4.3.- DISCUSION

En esta serie de experiencias, se observa una elevación en los niveles enzimáticos de los grupos Control e Intoxicado con respecto a los determinados en los ensayos descritos anteriormente.

El DMSO utilizado para vehiculizar las sustancias ensayadas es "per se" un tóxico celular, por lo que en este tipo de experiencias se recomienda que el volumen de DMSO administrado no supere el 1-1.5% del volumen total del medio de incubación. En el establecimiento de las condiciones de experimentación se añadían a cada vial 10 μ l de DMSO, lo que representa un 0.6% del volumen total de incubación. Para el ensayo de la actividad hepatoprotectora se utilizan 20 μ l de DMSO, lo que significa un 1.3% del volumen de la suspensión celular. Este incremento proporcional en la cantidad de DMSO sería el responsable de la elevación en el porcentaje de liberación enzimática observada.

Como se puede apreciar en la figura XLVI, el cianidanol presenta una actividad hepatoprotectora a las dosis de 0.01 y 0.1 mg/ml, lo que valida el diseño experimental utilizado.

La tabla XLIII muestra el porcentaje de variación con

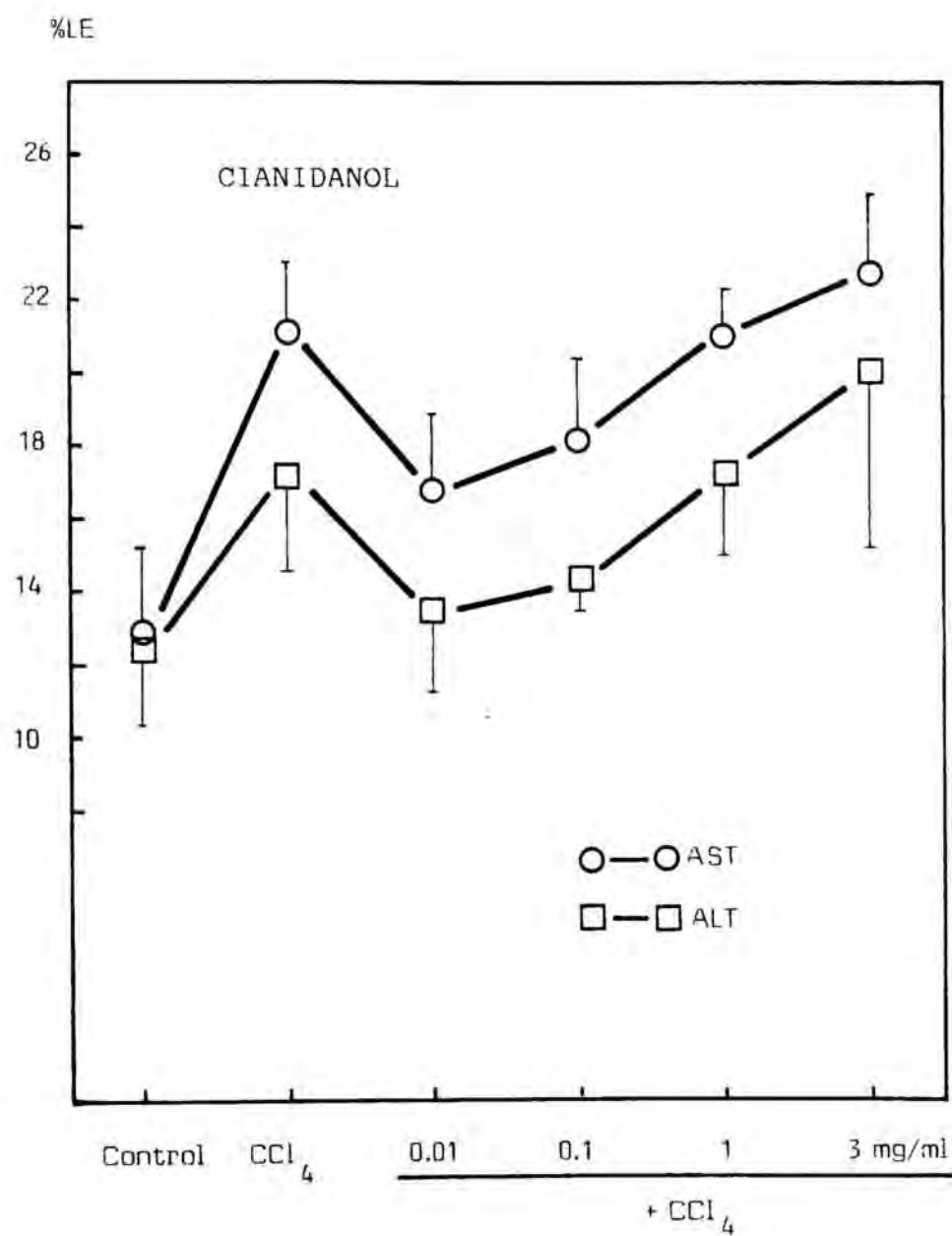


Figura XLVI

mg/ml	0.01	0.1	1	3
Ac. Cafeico				
AST	↓ 12.5%	↓ 17.0%	↓ 22.5%	-
ALT	-	-	↓ 34.6%	↓ 18.5%
Ac. Quínico				
AST	↓ 22.3%	-	-	-
ALT	↓ 19.6%	-	-	-
Ac. Isoclorogénico				
AST	-	-	↑ 12.0%	
ALT	-	-	-	
Címarina				
AST	↓ 13.3%	↓ 11.8%	↓ 13.3%	↓ 18.7%
ALT	↓ 11.8%	↓ 9.1%	↓ 24.8%	↓ 28.1%
7-glucosil luteolina				
AST	↓ 9.5%	↓ 15.7%	↓ 12.8%	-
ALT	↓ 11.6%	↓ 17.2%	↓ 11.6%	↑ 11.6%
Extracto de Acetato de Etilo				
AST	↓ 30.0%	↓ 21.6%	↑ 11.6%	↑ 20.0%
ALT	↓ 25.8%	↓ 22.5%	↑ 28.0%	↑ 15.9%

Tabla XLIII

respecto al grupo Intoxicado para aquellas sustancias que poseen actividad. Todos los valores indicados presentan una significación estadística igual o superior a $p < 0.05$.

Con el objeto de verificar que el comportamiento observado se debía estrictamente a una acción hepatoprotectora, se estudió la influencia directa de estos compuestos sobre la actividad transaminasa. Para ello, se utilizó un suero control (Precipath, Boehringer Mannheim). Una vez reconstituido y dividido en alícuotas, se añadieron, a cada una de ellas, los compuestos estudiados a las concentraciones ensayadas. A continuación, se determinaron los niveles de AST y ALT. En este caso no se efectuó la dilución 1/10, necesaria para la valoración de las suspensiones de hepatocitos.

Los resultados se expresan en la tabla XLIV. Se puede apreciar que el DMSO, por sí solo, presenta una acción inhibidora sobre la ALT. Por otra parte, el cianidanol no posee ningún efecto sobre la actividad de estas enzimas.

De los tres derivados cafeilquínicos ensayados, únicamente manifiesta propiedades hepatoprotectoras la cinarina (Fig. XLVII). Es de destacar que este compuesto, a la dosis de 3 mg/ml, eleva "per se" los valores de ALT, por lo que, si se tiene en cuenta este dato, la disminución observada en el estudio con hepatocitos es aún más acusada que la que reflejan los resultados numéricos. El ácido clorogénico no altera el proceso tóxico desencadenado por el CCl_4 , mientras que el ácido isoclorogénico, a la dosis de 1 mg/ml, lo potencia, elevando el %LE de la AST (Fig. XLVIII).

	AST (U/l)			ALT (U/l)		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control sin DMSO	2	132.0	±2.6	2	112.2	±0.4
Control con DMSO	4	126.7	±2.1	4	104.6 [#]	±1.4
Cianidanol (0.1 mg/ml)	4	126.7	±3.1	4	103.3	±2.9
Cinarina (3 mg/ml)	4	122.5	±6.9	3	110.2 [*]	±2.1
Cinarina (1 mg/ml)	4	125.8	±2.9	4	103.2	±0.9
Ac. Cafeico (1 mg/ml)	4	122.7 [*]	±1.0	4	95.6 [*]	±4.2
Ac. Quínico (0.01 mg/ml)	3	129.2	±1.8	4	103.4	±1.5
7-glucosil luteolina 3 mg/ml	3	146.2 [*]	±4.1	4	112.0 [*]	±5.3
1 mg/ml	4	139.3 [*]	±2.9	4	110.9 [*]	±1.4
Ac. Protocatéquico (0.1 mg/ml)	4	127.3	±2.2	4	105.5	±3.0
Ac. p-Cumárico (0.01 mg/ml)	4	126.7	±2.9	4	105.4	±0.5
<p># Diferencia significativa para p<0.01 con respecto al grupo Control (sin DMSO)</p> <p>* Diferencia significativa para p<0.01 con respecto al grupo Control (con DMSO)</p>						

Tabla XLIV

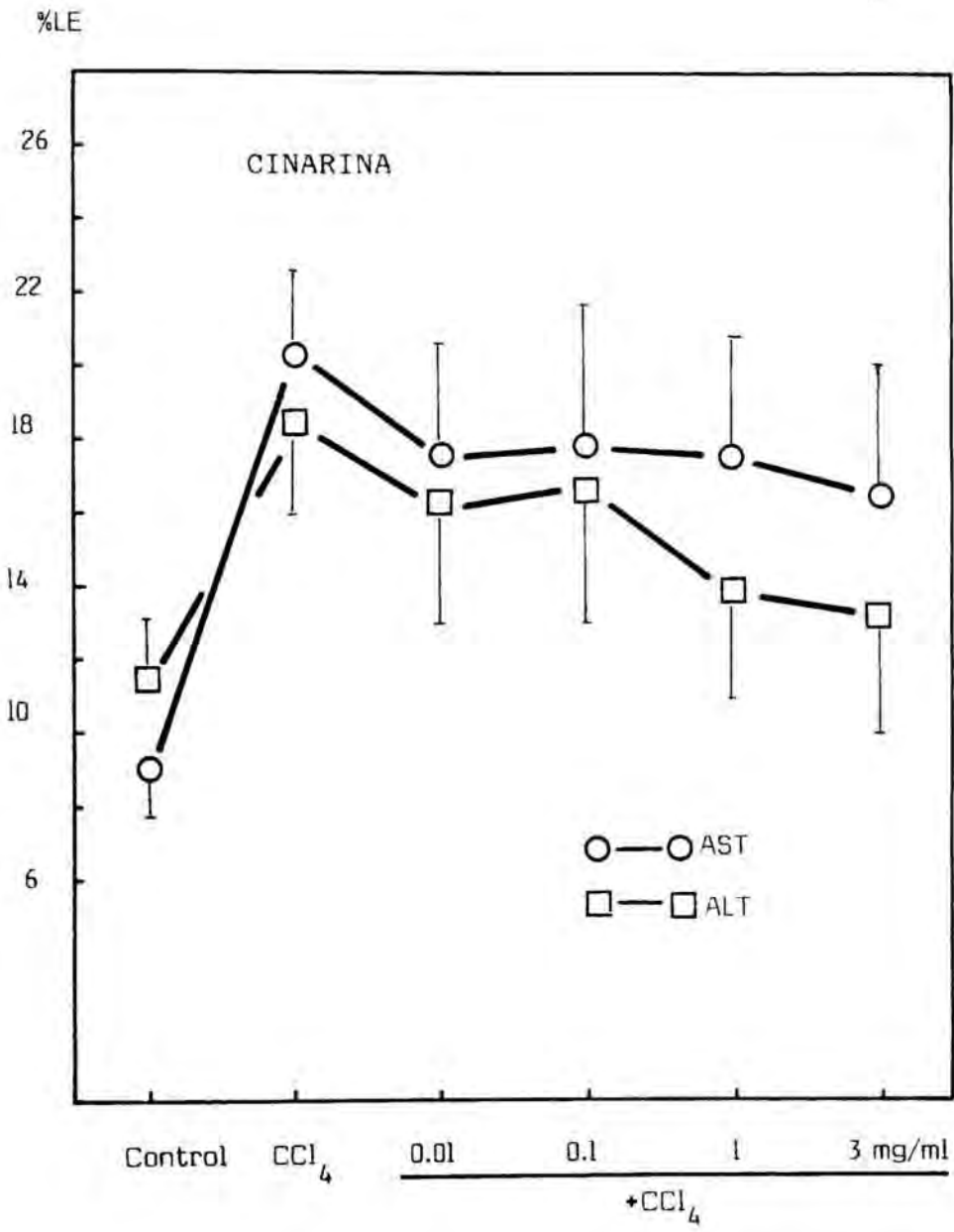


Figura XLVII

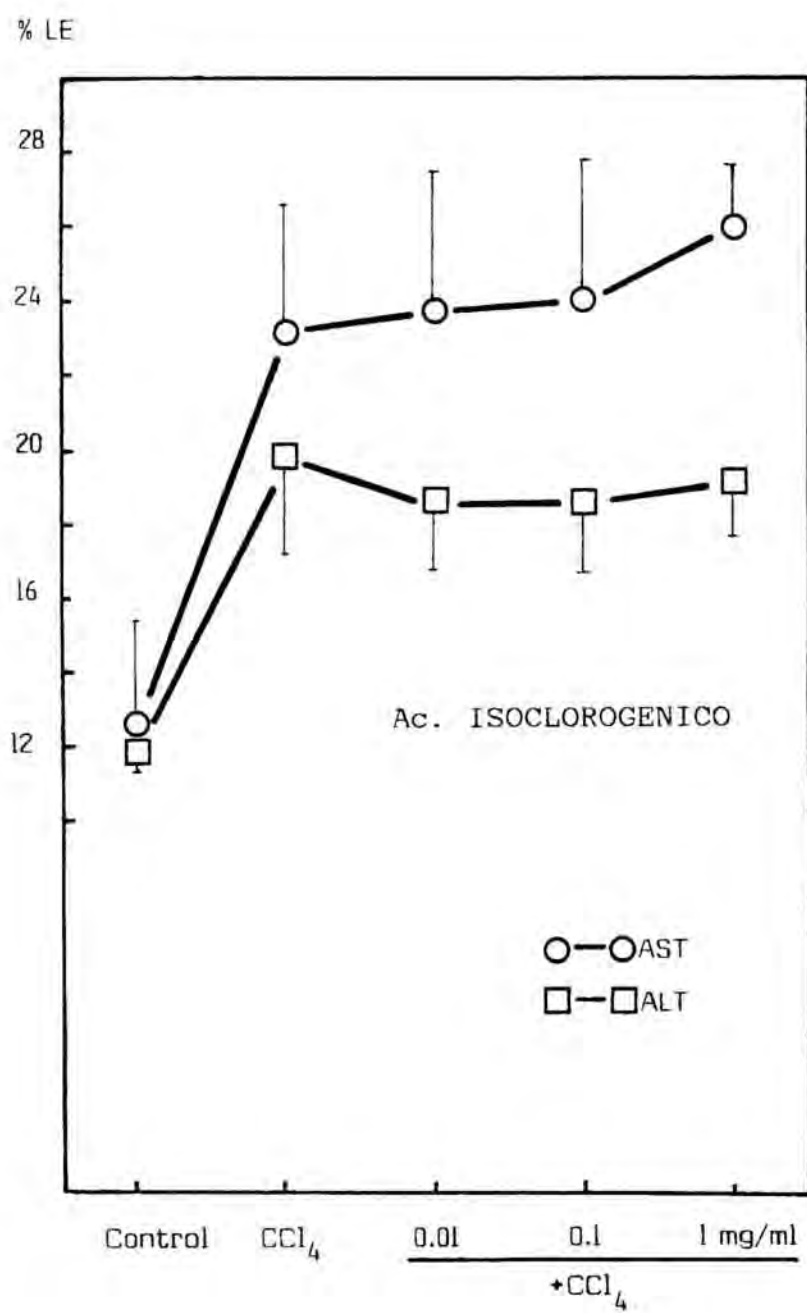


Figura XLVIII

Asimismo, se valoró la actividad del ácido cafeico y del ácido quínico, dado que son integrantes estructurales de los compuestos anteriormente citados. El ácido quínico evidencia propiedades hepatoprotectoras, disminuyendo los niveles de AST y ALT a la dosis de 0.01 mg/ml (Fig. XLIX). El ácido cafeico se muestra activo en el rango de concentraciones estudiado, pero con una selectividad diferente según el enzima valorado (Fig. L). Así, a las dosis de 0.01 y 0.1 mg/ml es efectivo sobre la AST, mientras que a la dosis de 3 mg/ml sólo disminuye los niveles de ALT. Únicamente actúa sobre ambas enzimas a la concentración de 1 mg/ml. Sin embargo, en la interpretación de estos resultados, se ha de considerar que el ácido cafeico inhibe, aunque ligeramente, la actividad transaminasa.

Es de destacar un hecho importante. En un principio, se podría atribuir la acción hepatoprotectora de la cinarina a la actividad conjunta de los productos de su hidrólisis, ácidos cafeico y quínico, producida a pH 7.4. No obstante, los ácidos clorogénico e isoclorogénico, isómeros de la cinarina y constituidos igualmente por ambos compuestos, no manifiestan ninguna propiedad en este sentido. Por tanto, la actividad encontrada debe atribuirse a la interacción específica de cada una de estas sustancias con estructuras diferentes del hepatocito.

La 7-glucosil luteolina posee la máxima actividad hepatoprotectora a la dosis de 0.1 mg/ml (Fig. LI). En este compuesto se dan una serie de circunstancias similares a las descritas para la cinarina. La 7-glucosil luteolina altera "per se"

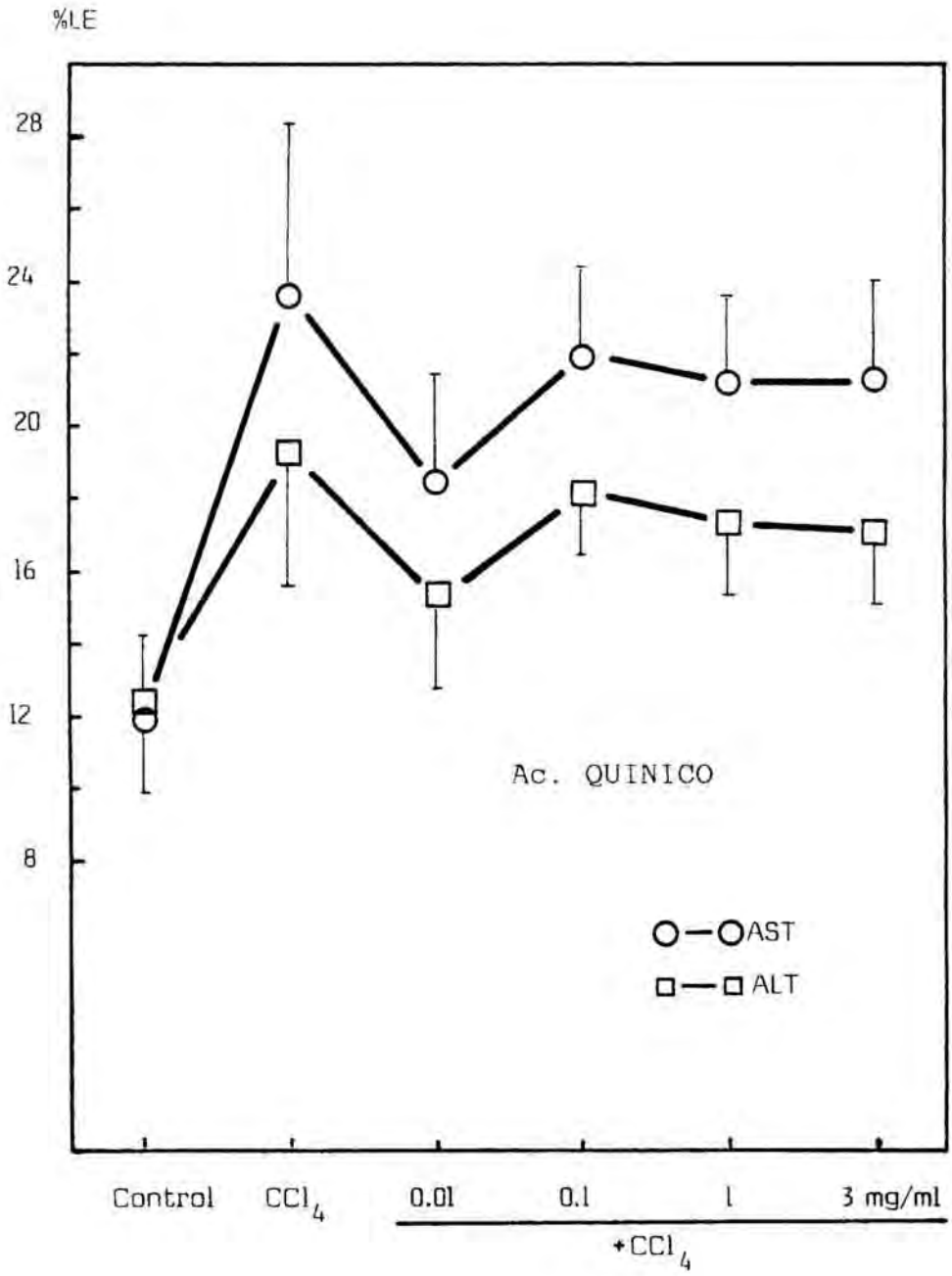


Figura XLIX

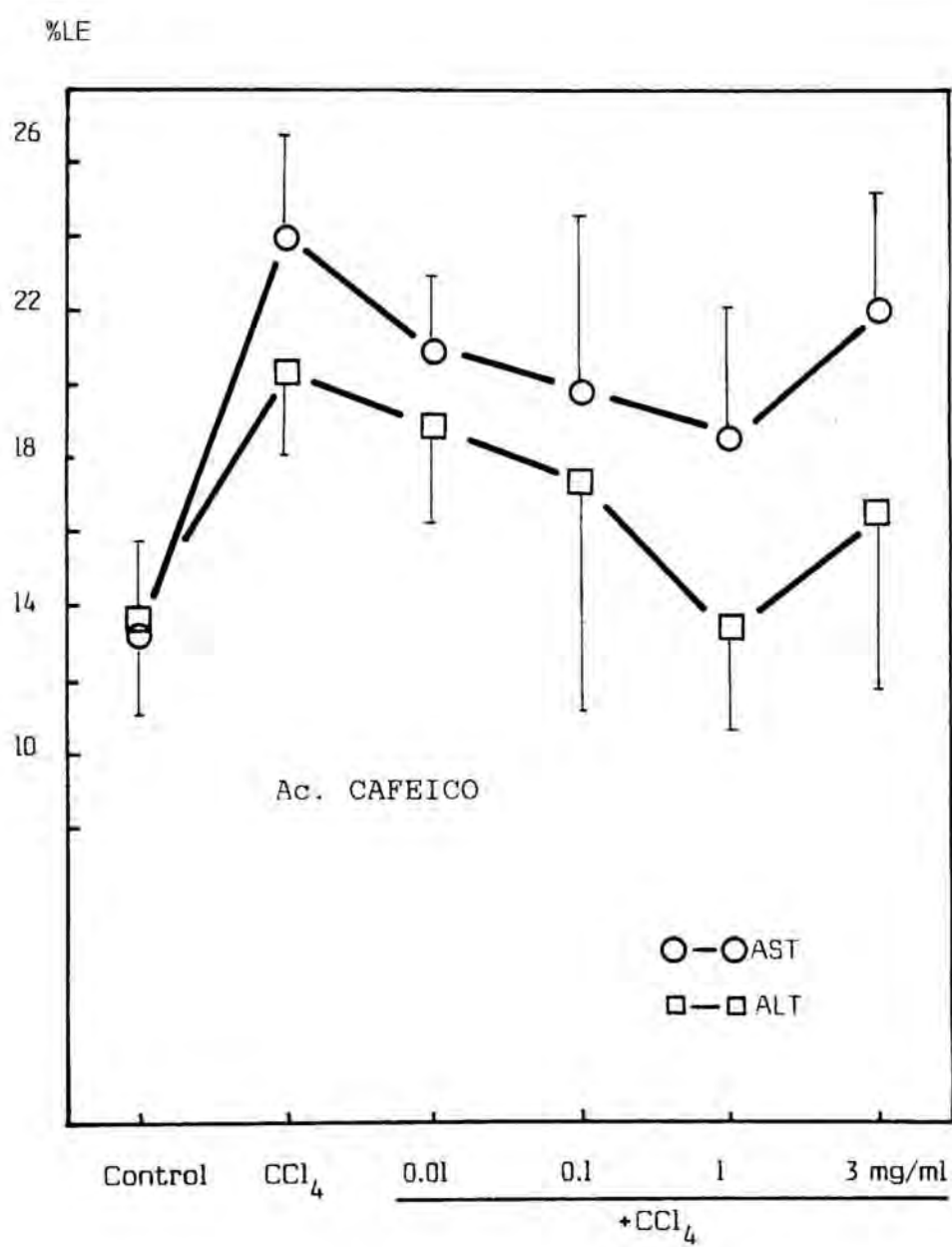


Figura L

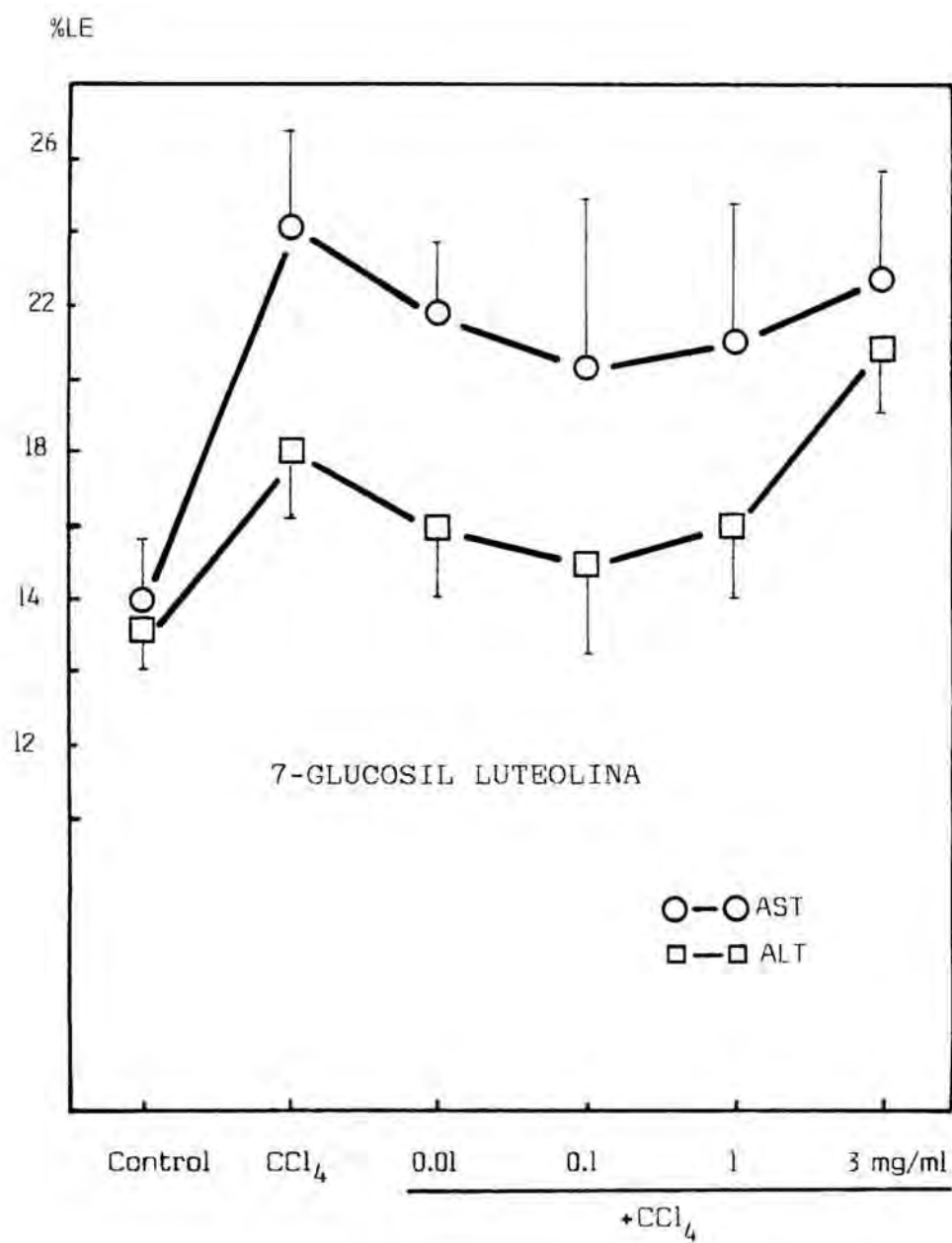


Figura LI

la determinación de transaminasas, incrementando anormalmente sus valores a las dosis de 1 y 3 mg/ml. Esto implica que el efecto hepatoprotector detectado a la concentración de 1 mg/ml es aún más intenso, ya que es capaz de contrarrestar la elevación enzimática causada. El hecho de que esté aumentada la liberación de ALT respecto al grupo Intoxicado, a la dosis de 3 mg/ml, se debería a una interferencia con el método analítico, más que a una manifestación tóxica.

El extracto de acetato de etilo de Cynara scolymus L. posee un comportamiento similar, actuando como hepatoprotector a las dosis de 0.01 y 0.1 mg/ml (máximo descenso respecto al resto de los compuestos ensayados) y elevando los niveles enzimáticos a las concentraciones superiores (Fig. LII).

Un hecho que parece corroborar la especificidad de acción es que, según la sustancia estudiada, la actividad es más marcada sobre un determinado enzima. Así, el ácido isoclorogénico afecta exclusivamente los niveles de AST, mientras que la 7-glucosil luteolina o el extracto de acetato de etilo modifica principalmente la ALT. Dado que ambas enzimas presentan una distribución intracelular distinta, este fenómeno podría interpretarse como una interacción con diferentes estructuras celulares. Sin embargo, en función de los resultados obtenidos con las sustancias aisladas, no es posible descartar dos tipos de manifestaciones. Una de carácter específico, evidente a concentraciones bajas y responsable de la actividad estrictamente hepatoprotectora, y otra, de tipo general, detectada a concentraciones altas, que actuaría más como interferencia en el método de valoración enzimática y daría lugar a una

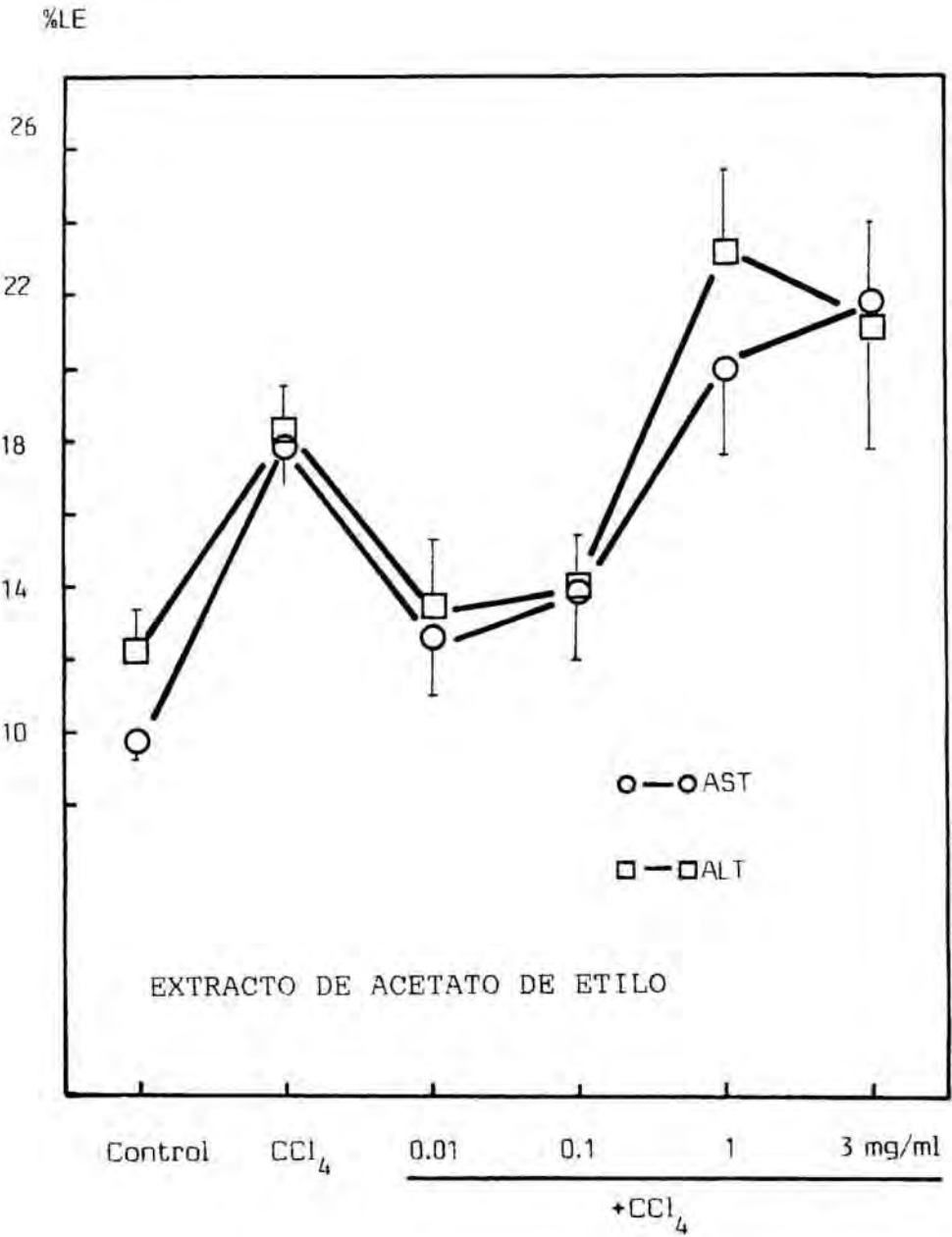


Figura LII

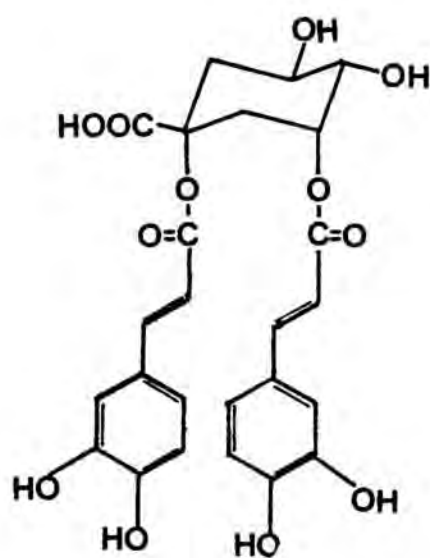
supuesta potenciación de la toxicidad.

De los tres isómeros estudiados cinarina, ácido clorogénico e isoclorogénico (mezcla de los ácidos 3-4, 3-5 y 4-5 dicafeilquínicos), el primero presenta dos particularidades. Es la única sustancia que posee actividad hepatoprotectora manifiesta y, además, es el único compuesto en el que los dos sustituyentes cafeicos se encuentran en posición axial. Dado que el ácido cafeico también tiene una cierta actividad hepatoprotectora, ésto indujo a pensar en la posibilidad de que la cinarina actuara orientando espacialmente las moléculas de ácido cafeico, de forma que pudieran ejercer su acción.

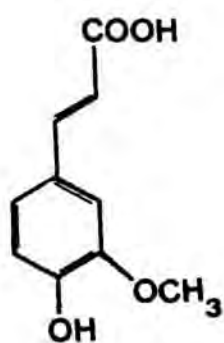
El ácido cafeico presenta dos grupos fenólicos, en posiciones meta y para. Se pensó conveniente investigar la actividad de otros compuestos relacionados estructuralmente. Para ello, se ensayaron los ácidos ferúlico, p-cumárico y protocatéquico, cuyas estructuras se detallan en la figura LIII.

Los resultados obtenidos se exponen en las tablas XLV, XLVI y XLVII. Como se puede observar en las figuras LIV y LV, el ácido p-cumárico y el ácido protocatéquico presentan una débil actividad hepatoprotectora a dosis bajas; específicamente, el primero sólo actúa sobre la ALT. Por otra parte, ambos compuestos no midifican la actividad transaminasa (tabla XLVIII).

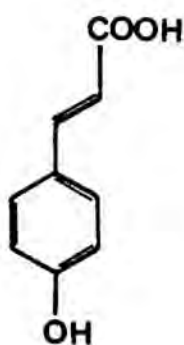
En cualquier caso, dada la escasa actividad de estas sustancias, parece necesaria la presencia del grupo catecol para el ejercicio de una actividad hepatoprotectora. Este requerimiento estructural se ha demostrado asimismo para la capacidad de unión del ácido cafeico a la sero albúmina bovina (ADZET y



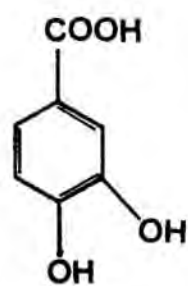
CINARINA



Ac. FERULICO



Ac p-CUMARICO



Ac. PROTOCATEQUICO

Figura LIII

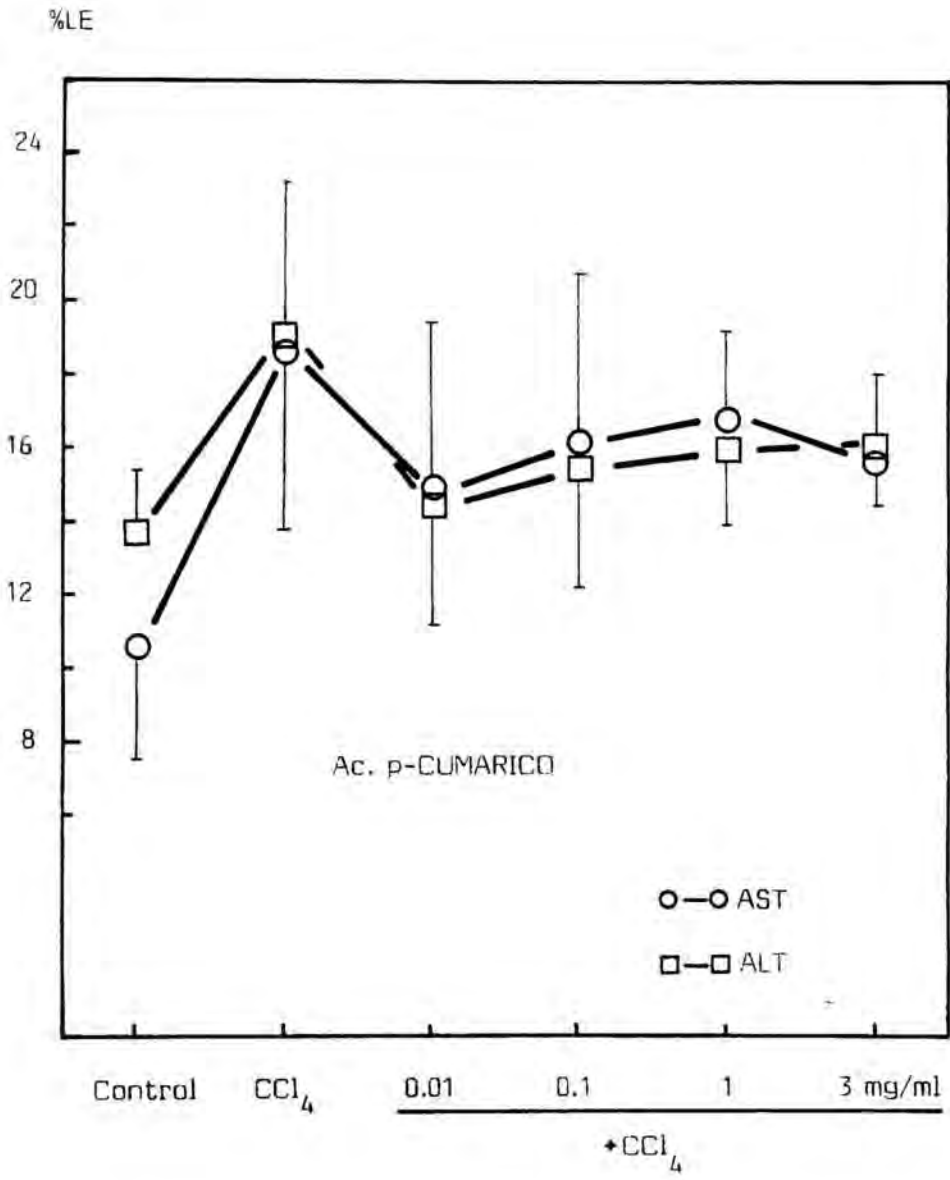


Figura LIV

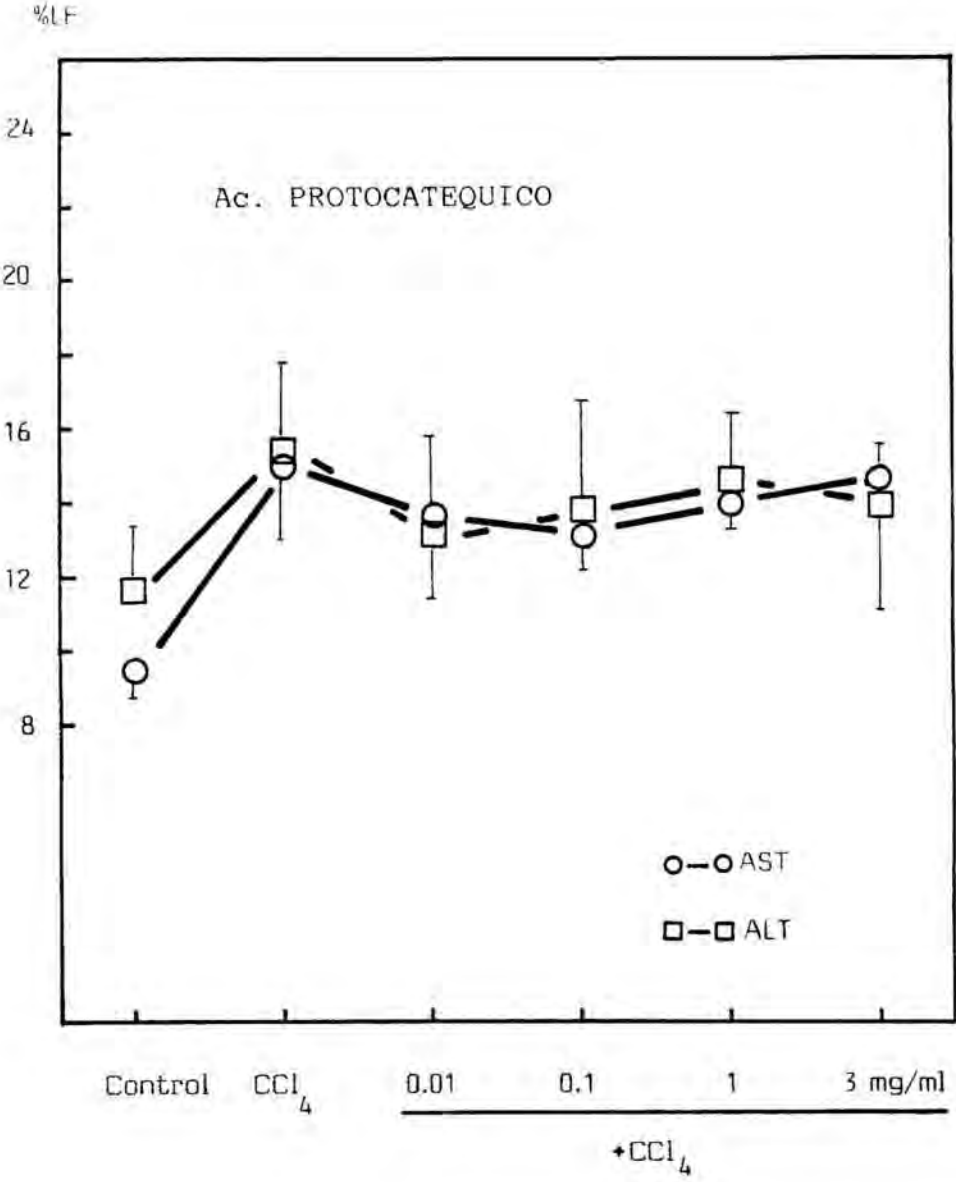


Figura LV

Tabla XLV: Ac. Ferúlico

	AST			ALT		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	5	9.5	± 1.1	5	12.4	± 2.0
CCl ₄	6	15.7	± 2.8	6	16.5	± 2.9
0.01 mg/ml	6	13.9	± 1.6	6	14.6	± 2.5
0.1 mg/ml	6	13.6	± 2.1	6	15.5	± 1.8
1 mg/ml	5	14.2	± 2.2	5	16.0	± 3.2
3 mg/ml	5	15.4	± 1.7	5	17.0	± 1.4

	AST			ALT		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	5	10.6	± 3.1	5	13.8	± 1.6
CCl ₄	5	18.7	± 5.0	5	19.0	± 4.2
0.01 mg/ml	5	14.8	± 4.6	5	14.5**	± 3.3
0.1 mg/ml	5	16.2	± 4.5	5	15.6	± 3.4
1 mg/ml	5	16.8	± 2.3	5	16.1	± 2.2
3 mg/ml	5	15.8	± 1.4	5	16.0	± 2.0
** Diferencia significativa para $p < 0.05$ respecto al CCl ₄						

Tabla XLVI: Ac. p-Cumárico

	AST			ALT		
	n	\bar{x}	σ_{n-1}	n	\bar{x}	σ_{n-1}
Control	6	9.5	± 0.6	6	11.8	± 1.6
CCl ₄	6	15.1	± 2.1	6	15.5	± 2.3
0.01 mg/ml	6	13.7	± 2.2	6	13.4**	± 2.1
0.1 mg/ml	6	13.4**	± 1.1	6	13.9	± 2.8
1 mg/ml	6	14.1	± 0.5	6	14.3	± 2.1
3 mg/ml	6	14.5	± 1.1	6	14.1	± 3.1
** Diferencia significativa para p<0.05 respecto al CCl ₄						

Tabla XLVII: Acido Protocatéquico

col. 1985), así como para la actividad agonista parcial sobre el receptor alfa-adrenérgico de la pared vascular (ESCUBEDO y col. 1985). Esta hipótesis concuerda con el hecho de que el ácido protocatéquico, único de los compuestos ensayados que conserva dos grupos hidroxilo en su estructura, disminuye la liberación en el medio de ambos tipos de enzimas.

Conclusiones

INTOXICACION POR CCl_4 -. En animal entero:

- 1.- Se constata, a nivel plasmático, el tropismo mitocondrial del CCl_4 , traducido en una elevación de AST y GLDH.
- 2.- Los niveles de AP y colesterol no se modifican, por lo que se descarta su utilidad en el diagnóstico de esta hepatopatía en la rata.
- 3.- Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos no reflejan la esteatosis hepática producida.
- 4.- Se manifiesta una coproporfirinuria moderada, detectable a las 48 horas después de la intoxicación.
- 5.- En el tejido hepático, se produce un proceso inflamatorio, con disminución del contenido proteico. La acumulación de triglicéridos es patente desde los primeros estadios de la intoxicación.
- 6.- La lipoperoxidación es mínima hasta 8 horas despues de la intoxicación. Posteriormente, el proceso se propaga a todo el tejido, alcanzándo se valores máximos a las 24 horas.
- 7.- Se produce un aumento del GSH hepático, dosis-dependiente, y se mantiene el ritmo circadiano del tripéptido.

- 8.- La administración de CCl_4 provoca una brusca deplección inicial del glucógeno hepático, con mantenimiento de concentraciones superiores a las normales en las fases más tardías de la intoxicación.

-. En hepatocitos aislados:

- 9.- La lesión tóxica manifiesta una notable similitud con la producida en el animal entero, comportando una liberación masiva de AST en el medio y, en menor grado, de ALT.

TRATAMIENTO FARMACOLOGICO

-. En animal entero:

- 10.- El extracto metanólico de Cynara scolymus L. es el único que presenta propiedades terapéuticas:
- . Impide las alteraciones provocadas por el CCl_4 en el metabolismo y eliminación de la BSP. Sin embargo, la activación del funcionalismo no comporta, "per se", una protección frente a la lesión celular.
 - . Estimula el proceso regenerativo hepático, siendo este fenómeno detectable a las 48 horas de la intoxicación.
- 11.- La administración de cinarina y ácido cafeico produce una normalización en los niveles tisulares de proteínas y GSH, así como una disminución del proceso inflamatorio hepático.

-. En hepatocitos aislados:

- 12.- El ácido cafeico y la cinarina, al disminuir la liberación de AST y ALT al medio de incubación, manifiestan una actividad hepatoprotectora.
- 13.- Existe una relación entre la actividad y la estructura química de los compuestos estudiados, debida a la presencia del grupo catecol. También parece necesaria una determinada orientación de los grupos activos para que se manifieste el efecto hepatoprotector.
- 14.- Los ácidos clorogénico e isoclorogénico carecen de propiedades hepatoprotectoras.
- 15.- La 7-glucosil luteolina y el extracto de acetato de etilo presentan un comportamiento dual. A dosis bajas evidencian un notable efecto hepatoprotector, mientras que a concentraciones superiores potencian la toxicidad del CCl_4 . Si bien la 7-glucosil luteolina modifica la actividad transaminasa, el extracto incrementa los efectos del CCl_4 en animal entero, lo que no permite atribuir el comportamiento observado a una mera interferencia en el método de valoración enzimático.

Bibliografía

OBRAS DE CONSULTA GENERAL

ADOLPH L., LORENZ R. (1980)

"Diagnóstico enzimático en las enfermedades de corazón, hígado y páncreas"

S. Karger. Basilea.

CYBA FOUNDATION SYMPOSIUM 55 (NEW SERIES) (1978)

"Hepatotrophic Factors"

Elsevier-Excerpta Medica. Amsterdam.

FOUET P. (1978)

"Abrégé d'hépatologie"

Masson. París.

HARRIS R.A., CORNELL N.W. (1983)

"Isolation, characterization and use of hepatocytes"

Elsevier. Amsterdam.

PLAA G:L., HEWITT W.R. (1982)

"Toxicology of the liver"

Raven Press. Nueva York.

RODES J., BRUGUERA M., SANCHEZ-TAPIAS J.M. (1982)

"Manual de las enfermedades del hígado y vías biliares"

Científico-Médica. Barcelona.

SLATER T.F. (1978)

"Biochemical mechanisms of liver injury"

Academic-Press. Nueva York.

ZAKIM D., BOYER T. (1982)

"Hepatology. A text-book of liver disease"

W.D. Saunders Company. Nueva York.

REFERENCIAS

- ADZET T., CAMARASA J., ESCUBEDO E., MERLOS M. (1984)
 "Estudio "in vitro" de la interacción polifenol-proteína"
 Proc. 2nd Eur. Cong. Biopharm. Pharmacokin., 2, 87-96.
- ADZET T., PUIGMACIA M. (1985)
 "High performance liquid chromatography of caffeoylquinic acid
 derivatives of *Cynara scolymus* L. leaves"
 J. Chromatogr., 348 (2), 447-453.
- ALBRECHT R. (1972)
 "Quelques aspects des processus biochimiques intervenant au ni
 veau des enzymes microsomales hépatiques"
 Thérapie, 27, 751-771.
- AMATUS LUSITANUS (1551)
 "Curatium medicinalium centuriae septem"
 Ed. Torrentinus. Florencia.
- AMATUS LUSITANUS (1557)
 "Dioscoridis anarzarbei de medica materia libros quinque
 enarrationes eruditissimae"
 Ed. Giordano Zilleti. Venecia.
- ANUNDI I., HOGBERG J., STAHL A. (1982)
 "Involvement of glutathione reductase in selenite metabolism
 and toxicity, studied in isolated rat hepatocytes"
 Arch. Toxicol., 30, 113-123.
- AUBERT S., FOURY C. (1979)
 "Couleur et pigmentation anthocyanique de l'artichaut
 (*Cynara scolymus* L.)"
 3^e Cong. Int. di Studi sul Carciofo, 27-30.

AXELROD J. (1982)

"The discovery of the microsomal drug-metabolizing enzymes"
Trends Pharmacol. Sci., 3 (10), 383-386.

BAILEY G.S., TAYLOR M.J., SELIVONCHICK D.P. (1982)

"Aflatoxin B₁ metabolism and DNA binding in isolated hepatocytes from rainbow trout"
Carcinogenesis, 3 (5), 511-518.

BAKKE J., GUSTAFSSON J-A. (1984)

"Mercapturic acid pathway metabolites of xenobiotics: generation of potentially toxic metabolites during enterohepatic circulation"
Trends Pharmacol. Sci., 5 (12), 517-521.

BARNES H.M., FELDMAN J.R., WHITE W.V. (1950)

"Isochlorogenic acid. Isolation from coffee and structure studies"
J. Amer. Chem. Soc., 72, 4178.

BARTOSHUK L.M., LEE CH-H., SCARPELLINO R. (1972)

"Sweet taste of water induced by artichoke (*Cynara scolymus*)"
Science, 178, 988-990.

BARUZZI M.C., ROVESTI P. (1972)

"Expériences sur l'action cutanée de l'acide chlorogénique en tant que bioactif reconstituant"
Parf. Cosm. Sav. France, 2 (2), 74-76.

BAST A., HAENEN G. (1984)

"Cytochrome P-450 and glutathione: what is the significance of their interrelationship in lipid peroxidation?"
Trends Biochem. Sci., 9 (12), 510-513.

BERNHARD H.D., THIELE K., PRETSCH E. (1979)

"Cynaratriol, ein neuer Guajanolid aus der Kardone Cynara cardunculus L. und der Artischoke C. scolymus L. (Compositae)"

Helv. Chim. Acta, 62 (4), 1288-1297.

BERRY M.N., FRIEND D.S. (1969)

"High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study"

J. Cell. Biol., 43, 506.

BERTOLANI F., DARDARI M., MASSA L. (1957)

"Significato e valore pratico della utilizzazione di un farmaco ad azione colocrina, l'ac. 1,4-dicaffeilchinico, nella indagine colangiocolecistografica con mezzo di contrasto endovenoso (ricerca sperimentale e clinica)"

Casa Editrice Ambrosiana, Milan.

BINAGLIA L., ROBERTI R., FRANCESCANGELI E., GORACCI G. (1976)

"Influenza della cinarina e dell'acido caffeico sulle velocità di sintesi della fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina epatica "in vitro" ed "in vivo" "

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turín.

BLANCKAERT N. (1983)

"Molecular aspects of bilirubin conjugation and secretion"

Verhandelingen, 14 (5), 427-456.

BOGAERT J.P., MORTIER F., JOUANY J.M., PELT J.M., DELAVEAU P. (1972)

"Acides organiques, en particulier, acides-alcohols de C. scolymus L. (Composées)"

Ann. Pharm. Fr., 30 (16), 401-408.

BOUCARD M., ABELA R. (1963)

"La fistule biliaire chez le rat. Nouvelle technique d'étude de l'activité choléretique"

Ann. Pharm. Fr., 21 (7-8), 551-559.

BOUCHERAT M., MALLEIN R. (1977)

"Diagnostic biochimique des porphyries"

En "Biochimie clinique". Ed. Girard M.L., Rousselet F. 9^e ed. Masson. Paris. 55-115.

BREL J. (1930)

"L'artichaut: étude historique, littéraire, agricole, alimentaire et médicale"

Ed. Amédée Legrand. Paris.

BRENNER D.P. (1974)

"Hepatogenous photosensitization. Induction and study in guinea-pigs"

J. Comp. Pathol., 84 (4), 555-568.

BUEGE J.A., AUST S.D. (1978)

"Microsomal lipid peroxidation"

Methods in Enzymol., 52 (C), 302-310.

BUTTERY R.G., GUADAGNI D.E., LING L.C. (1978)

"Volatile aroma components of cooked artichoke"

J. Agric. Food Chem., 26 (4), 791-793.

CAGEN S.Z., KLAASSEN C.D. (1982)

"Evaluation of hepatic storage of sulfobromophthalein in rats and dogs"

Toxicology, 25, 261-270.

CAIRELLA M., NASTA G., VECCHI L., VOLPARI B. (1976)

"La cinarina nella terapia dei danni epatici da iperalimentazione"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turin. 167-173.

CARLBERG I., MANNERVIK B. (1975)

"Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver"

J. Biol. Chem., 250 (14), 5475-5480.

CARUZZO C., CARNAGHI R., ENRICO-BENA L., De MARCO G. (1969)

"Considerazioni sull'attività dell'acido 1,4-dicaffeilchinico sulle frazioni lipidiche del siero nell'aterosclerosi"

Min. Med., 60, 4514-4518.

CIMA G., BONORA R. (1959)

"Effetti terapeutici dell'acido 1,4-dicaffeilchinico (cinarina) per via orale, rettale, endovenosa ed endoduodenale"

Min. Med., 50, 2288-2291.

CORBELLA A., GARIBOLDI P., SAMEK Z., JOMMI G., HOLUB M., DROZDZ B., BLOSZYK E. (1972)

"Absolute stereochemistry of cynaropicrin and related guaianolids"

J.C.S. Chem. Comm., 386-387.

CORSE J. (1953)

"A new isomer of chlorogenic acid from peaches"

Nature, 4382, 771-772.

CRONQUIST A. (1981)

"An integrated system of classification of flowering plants"

Columbia University Press.

COSSALI C., ROGNONI F. (1962)

"Osservazioni cliniche sull'impegno del glucosio-1-fosfato di arginina nella terapia epatica"

Atti 2^o Symp. Int. sui Glucidi Fosforilati, Milán.

CUCCHERINI B., NUSSBAMN S.J., SEEFF L.E., LUKACS L., ZIMMERMAN H.J. (1983)

"Stability of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities"

J. Lab. Clin. Med., 102, 370.

CURTIS M.T., GILFOR D., FARBER J.L. (1984)

"Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes"

Arch. Biochem. Biophys., 235 (2), 644-649.

CHADZAJ J.I., KUZNECOVA V.F. (1971)

"Über die Wirkung eines Artischockenextractes auf die Leber"

Farm. Toks., 34 (5), 685-688.

CHOMEL P.I.B. (1671)

"Abregé de l'histoire des plantes usuélles"

París.

DeEDS F., BOOTH A.N., JONES F.T. (1957)

"Methylation and dehydroxylation of phenolic compounds by rats and rabbits"

J. Biol. Chem., 225, 615-621.

DeMATTEIS F. (1967)

"Disturbances of liver prophyrin metabolism caused by drugs"

Pharmacol. Rev., 19 (4), 523-557.

DRANIK L.I. (1965)

"Polyphenolic compounds of Cynara scolymus II.- Extraction of cynarin salts"

Med. Prom. S.S.S.R., 19 (5), 13-15.

DRANIK L.I. (1966)

"Phenol compounds from some plants of the Compositae family.
Artichoke (*C. scolymus*)"
Fenol'nye Soedin, 50-60.

DRANIK L.I., CHERNOBAI V.T. (1967)

"The phenolic carboxylic acids of globe artichoke variety
Maikopsky 041"
Rast. Resur., 3 (2), 250-254.

DROZDZ B. (1968)

"Sesquiterpenic lactones II. Isolation of cynarolide, a new
sesquiterpenic lactone from the leaves of *Cynara scolymus* L."
Diss. Pharm. Pharmacol., 20 (2), 217-219.

DUBIN M., GOIJMAN S.G., STOPPANI O.M. (1984)

"Effect of nitroheterocyclic drugs on lipid peroxidation and
glutathione content in rat liver extracts"
Biochem. Pharmacol., 83 (21), 3419.

ECK M., DESBORDES F. (1934)

"Intêret de la mesure du pouvoir cholestérololytique du serum
pour l'étude du metabolisme du cholesterol"
C. R. Soc. Biol., 117, 428.

EGER W. (1964)

"The necrotropic liver-protective substances"
En "The Liver" vol. II. Academic Press. Nueva York. Cap. 26,
553-624.

ELLMAN G.L. (1959)

"Tissue sulphydryl groups"
Arch. Biochem. Biophys., 82, 70-77.

ESCUBEDO E., ADZET T., CAMARASA J. (1985)

"Acción del ácido cafeico sobre la musculatura lisa vascular"
Rev. Farmacol. Clin. Exp., 2 (3), 245.

FANDER U., HAAS W., KRONER H. (1982)

"The damage of the hepatic mixed functional oxygenase system
by CCl_4 : significance of incorporation of $^{14}\text{CCl}_4$ metabolites
in vivo"

Exp. Mol. Path., 36, 34-43.

FARAG R.S., KHEREBA A.H.A., HAMAMA A.A.M. (1980)

"Cardoon and artichoke interspecific hybrids as potential
source of edible oils"

Grasas y Aceites, 31 (1), 255-259.

FERREYRA E.C., De FENOS O.M., BERNACCHI A.S., De CASTRO C.R.,
CASTRO J.A. (1977)

"Treatment of carbon tetrachloride-induced liver necrosis with
chemical compounds"

Toxicol. Appl. Pharmacol., 42, 513-521.

FOLCH J., LESS M., SLORNE G.H. (1957)

"A simple method for the isolation and purification of total
lipides from animal tissues"

J. Biol. Chem., 226, 497.

FOUAD F.M., GOLDBERG M., RUHENSTROTH-BAUER G. (1983)

"Plasma protein determination as a clinical probe for liver
injury in rats induced by thioacetamide, alloxan or ixoten"

J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 21, 203-208.

FREDJ G., ROUSSELET F. (1983)

"Proposition d'un test pharmacocinétique pour l'exploration de
la fonction hepatocytaire"

Gastroentérol. Clin. Biol., 7 (4), 418.

FREEDMAN S.O., KUPREY I., SEHON A.H., (1961)

"Chlorogenic acid: An allergen in green coffee bean"

Nature, 192, 241.

FRIEDBERG T., BENTLEY P., STASIECKI P., GLATT H.R., RAPHAEL D., OESCH F. (1979)

"The identification, solubilization and characterization of microsome associated glutathione-S-transferases"

J. Biol. Chem., 254 (23), 12028-12033.

FRIMMER M. (1971)

"Intoxicación por amanitas"

Sandorama, 25, 21-23.

GAHNIAN R., ASSENOV I. (1976)

"Some pharmacological properties of "Cynara scolymus L." plants"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turín. 129-137.

GAITI A., BRUNETTI M., De MEDIO G.E. (1976)

"Sintesi del colesterolo, lanosterolo e squalene da acetato marcato, ed effetto della cinarina e dell'acido caffeico su ta le proceso nel fegato di ratto in vitro"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turín. 161-166.

GAJDOS A. (1967)

"Donnés recentes sur la biosynthese physiologique et phatologique des porphyrines. Mecanismes de la regulation quantitative"

En "Médecine et Biochimie (Problèmes d'actualité)". Masson. París. 129-164.

GARRET B.J., CHEEKE P.R., MIRANDA C.L., GOEGER D.E., BUHLER D. R. (1982)

"Consumption of poisonous plants (Senecio jacobaea, Symphytum officinale, Pteridium aquilinum, Hipericum perforatum) by rats: chronic toxicity, mineral metabolism and hepatic drug-metabolizing enzymes"
Toxicol. Lett., 10, 183-188.

GAZAVE J.M., ROGER C., ACHARD M., PARROT J-L. (1974)

"Polyphénols et resistance capillaire"
C.R. Ass. Gén. Groupe Polyphénols, Lyon.

GEORGES A., GERIN Y., DENEJ J., HEUKER H. (1970)

"Valeur pronostique des tests de dépistage d'hepatotoxicité chez le rat"
Proc. Eur. Soc. Study of drug toxicity, 11, 182-190.

GIORGI G., MICHELI L., SEGRE G. (1984)

"A diurnal variation of the glutathione content in rat liver and stomach"
IRCS Med. Sci., 40, 560-561.

GIORGI G., MARTINI P., MICHELI L., BRUNI G., DAL PRA P., SEGRE G. (1984)

"Studies on glutathione (GSH) content in various organs of rat: Possibilities of influence it and relationship with ACTH"
XXII Cong. It. Pharmacol. Soc., Bolonia, 237.

GOLDBERG A. (1971)

"Porphyrins and porphyrias"
En "Recent advances in haematology". Ed. Goldberg A., Brain M.C. Churchill Livingstone. Londres. 302-336.

GOMEZ-LECHON M.J., CASTELL J.V. (1982)

"Regeneración hepática: bases fisiológicas y control bioquímico"
Gastroenterol. Hepatol., 5 (5), 279-289.

GOPINATH C., PRENTICE D.E., STREET A.E., GROOK D. (1980)

"Serum bile acid concentration in some experimental liver lesions of rat"

Toxicology, 15, 113-127.

GORACCI G., De MEDIO E.G., BINAGLIA L., ROBERTI R., WOELK H. (1976)

"Attività fosfolipasiche A_1 ed A_2 in microsomi e mitocondri epatici di ratto, e concentrazioni dei fosfolipide: effetto della cinarina ed acido caffeico"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turin. 101-104.

GRANICK S., URATA G. (1963)

"Increase in activity of delta-aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine"

J. Biol. Chem., 238 (2), 821-827.

GRASES P.J., REUTTER W., LESCH R. (1972)

"Protective role of prednisolone upon galactosamine-induced hepatitis in rats"

G.E.N., 27 (2), 197-204.

GREEN C.E., RICE D.W., HSICH D.P.H., BYARD J.L. (1982)

"The comparative metabolism and toxic potency of aflatoxin B_1 and aflatoxin M_1 in primary cultures of adult-rat hepatocytes"

Fd. Chem. Toxic., 20, 53-60.

GUINOVART J.J. (1973)

"Análisis cinético de la glucógeno sintetasa de hígado de rana y su regulación"

Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

HABIG W.H., PABST M.J., JAKOKY W.B. (1974)

"Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation"

J. Biol. Chem., 249 (22), 7130-7139.

HANG H., SCHAUM W., STRIK W., ROWECK H. (1973)

"Enzyme activities in the regenerating rat liver after 66% hepatectomy with special reference to gluconeogenesis"

Acta Hepato-Gastroenterol., 20, 467-483.

HASSING J.M., ROSENBERG H., STOHS S.J. (1979)

"Acetaminophen-induced glutathione depletion in diabetic rats"

Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 25 (1), 3-11.

HECKERS H., DITTMAR K., SCHMAHL F.W., HUTH K. (1977)

"Inefficiency of cynarin as therapeutic regimen in familial type II hyperlipoproteinaemia"

Atherosclerosis, 26, 249-253.

HERRERA L. (1970)

"Utilization of glicerol by rat adipose tissue "in vitro" "

Biochem. J., 120, 433.

HETU C., YELLE L., JOLY J-G. (1982)

"Influence of ethanol on hepatic glutathione content and on the activity of glutathione S-transferases and epoxide hydrase in the rat"

Drug Metab. Dispos., 10 (1), 246.

HOWARD R.B., PESCH L.A. (1968)

"Respiratory activity of intact, isolated parenchimal cells from rat liver"

J. Biol. Chem., 243, 3105-3109.

IGLESIAS J., PUIGMACIA M., QUILES J.M. (1985)

"Influence de la méthode d'extraction sur la teneur en polyphénols des extraits de *Cynara scolymus* L."

Pl. méd. et phyt., 19, 202-210.

JAMES R.C., GOODMAN D.R., HARBISON R.D. (1982)

"Hepatic glutathione and hepatotoxicity: changes induced by selected narcotics"

J. Pharmacol. Exp. Ther., 221 (3), 708-714.

JAMES R.C., HARBISON R.D. (1982)

"Hepatic glutathione and hepatotoxicity. Effects of cytochrome P-450 complexing compounds SKF 525-A, L- α acetylmethadol (LAAM), norLAAM, and piperonyl butoxide"

Biochem. Pharmacol., 31 (10), 1829-1835.

JERNIGAN J.D., HARBISON R.D. (1982)

"Role of biotransformation in the potentiation of halocarbon hepatotoxicity by 2,5-hexanedione"

J. Toxicol. Environ. Health, 9, 761-781.

KAPLAN M.M., BRENSILVER H.L. (1975)

"Significance of elevated liver alkaline phosphatase in serum"

Gastroenterology, 68 (A-221), 1078.

KARON H. (1974)

"Biological problems in liver regeneration"

Acta Hepato-Gastroenterol., 21, 403-410.

KEMENY M.M., SUGARBAKER P.H., SMITH T.J., EDWARDS B.K., SHAWKER T., VERMESS M., JONES A.E. (1982)

"A prospective analysis of laboratory tests and imaging studies to detect hepatic lesions"

Ann. Surg., 195 (2), 163-167.

KERPEL C. (1961)

"Mechanism of fatty acid assimilation in adipose tissue"

Biochim. Biophys. Acta, 46, 495.

KETTERER B., MEYER D., TAYLOR J., BURCHELL B. (1984)

"Glutathione transferases and their role in xenobiotic metabolism"

Trends Pharmacol. Sci., 9 (8), 319-320.

KISANZI D.N., LECK B.F., LUCAS K.S. (1981)

"Hepatic blood flow, oxygen uptake and volatile fatty acid utilization in sheep treated with carbon tetrachloride"

J. Physiol., 324, 73.

KISO Y., TOHKIN M., HIKINO H. (1983)

"Assay method for antihepatotoxic activity using galactosamine-induced cytotoxicity in primary-cultured hepatocytes"

J. Nat. Prod., 46 (6), 841-847.

KLOCKARDS M., WEGELINS O. (1969)

"Lysosomal enzymes in regenerating rat liver"

Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 131, 218-222.

KOSHIHARA Y., NEICHI T., MUROTA S.I., LAO A.N., FUJIMOTO Y., TATSUMO T. (1984)

"Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis"

Biochim. Biophys. Acta, 792, 92.

KRAL E., SONTAG O. (1982)

"Elektrochemische oxydation von flavonoiden an einer glasartigen kohlenstoffelektrode"

Mikrochim. Acta, 2, 29-41.

KUO CH-H., HOOK J.B. (1982)

"Depletion of renal glutathione content and nephrotoxicity of cephaloridine in rabbits, rats, and mice"

Toxicol. App. Pharmacol., 63, 292-302.

LATTANZIO V., MORONE I. (1979)

"Variations of the ortodiphenols content of *Cynara scolymus* L. during growing seasons"

Experientia, 35, 993-994.

LAUTERBURG B.H., SMITH C.V., HUGHES H., MITCHELL J.R. (1982)

"Determinants of hepatic glutathione turnover: toxicological significance"

Trends Pharmacol. Sci., 3 (6), 245-248.

LE BIGOT J.F., KIECHEL J.R., GUERRET M., BEGNE J.M., GUILLOUZO A. (1981)

"Utilisation d'hepatocytes isolés et en culture dans les études de métabolisme des médicaments"

1^{er} Cong. Eur. Biopharm. Pharmacocin., Clermont-Ferrand, 322-328.

LECLERC H., DECAUX F. (1939)

"L'action diurétique et dechlorurante de quelques plantes diurétiques"

Cong. de la Diurèse. André Bruilliard. Saint Dizier. 27-29.

LEMERY N. (1698)

"Traité universel des drogues"

I ed. Paris.

LEVIN W., LU A.Y.H., JACOBSON M., KUNTZMAN R., LEE J., McCAY P.B. (1973)

"Lipid peroxidation and the degradation of cytochrome P-450 heme"

Arch. Biochem. Biophys., 158, 842-852.

LIETTI A. (1977)

"Choleretic and cholesterol lowering properties of two artichoke extracts"

Fitoterapia, 48 (4), 153-158.

LINDER M.C., MOOR J.R., SCOTT L.E., MUNRO H.N. (1973)

"Mechanism of sex difference in rat tissue iron stores"

Biochim. Biophys. Acta, 297, 70-80.

LOWREY K., GLENDE E.A., RECKNAGEL R.O. (1981)

"Destruction of liver microsomal calcium pump activity by carbon tetrachloride and bromotrichloromethane"

Biochem. Pharmacol., 30, 135-140.

LOWREY K., GLENDE E.A., RECKNAGEL R.O. (1981)

"Failure of ethanol or isopropanol pretreatment to affect carbon tetrachloride-induced inhibition of hepatic microsomal calcium pump activity"

Drug Chem. Toxicol., 4 (3), 263-273.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR L., RANDALL R.J. (1951)

"Protein measurement with the Folin phenol reagent"

J. Biol. Chem., 193, 265.

LU A.Y.H., LEVIN W. (1974)

"The resolution and reconstitution of the liver microsomal hydroxylation system"

Biochem. Biophys. Acta, 344, 205-240.

LU A.Y.H., WEST S.B. (1980)

"Multiplicity of mammalian microsomal cytochromes P-450"

Pharmacol. Rev., 31 (4), 277-295.

MANCINI M., ORIENTE P., D'ANDREA L. (1961)

"Hypocholesterolemic effects of quinic acid 1,5-dicaffeate in atherosclerotic patients"

Proc. Symp. Drugs affecting lipid metabolism. Garattini e Paoletti. Amsterdam. 533-537.

MANCINI M., ORIENTE P., D'ANDREA L. (1960)

"Impiego terapeutico dell'acido 1,4-dicaffeilchinico, principio attivo del carciofo"

Min. Med., 51, 2460-2463.

MANSUY D. (1979)

"Activation des composés organiques exogènes par les cytochromes P-450. Implications en Pharmacologie et en Toxicologie"

En "Mises au point de Biochimie Pharmacologique". Ed. Siest G., Heusghem C., 2^a ed. Masson. Paris. 123-146.

MARMO E., MIELE E. (1962)

"Ricerche sperimentali su alcune preparazioni di cinarina (Ac. 1,4-dicaffeilchinico) iniettabili"

Il Farmaco, Ed. Pr., 17 (1), 28-43.

MARS G., BRAMBILLA G. (1976)

"Azione dell'acido 1,5-dicaffeilchinico (cinarina) sulla ipertrigliceridemia nell'età avanzata"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turin. 189-194.

MASON R.P., CHIGNELL C.F. (1982)

"Free radicals in Pharmacology and Toxicology. Selected topics"

Pharmacol. Rev., 33 (4), 189-211.

- MASQUELIER J., MICHAUD J., LAPARA J., DUMON M.C. (1979)
 "Pycnogenols: un novel éssor thérapeutique des dérivés catechiques"
 Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 118, 99-108.
- MASQUELIER J., MICHAUD J., LAPARA J., DUMON M.C. (1979)
 "Flavonoïdes et pycnogenols"
 Int. J. Vit. Nutr. Res., 49 (3), 307-311.
- MEISTER A., ANDERSON M.E. (1983)
 "Glutathione"
 Ann. Rev. Biochem., 52, 711-760.
- MEISTER A. (1981)
 "Metabolism and functions of glutathione"
 Trends Pharmacol. Sci., 2 (9), 231-234.
- MEISTER A. (1984)
 "New aspects of glutathione biochemistry and transport: selective alteration of glutathione metabolism"
 Fed. Proc., 43 (15), 3031-3042.
- MICHAUD J. (1967)
 "A new artichoke extract"
 Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 106 (4), 181-190.
- MILLER G.L. (1959)
 "Protein determination for large numbers of samples"
 Anal. Chem., 31, 964.
- MIRANDA C.L., BUHLER D.R., RAMSDELL H.S., CHEEKE P.R., SCHMITZ J.A. (1982)
 "Modifications of chronic hepatotoxicity of pyrrolizidine (Senecio) alkaloids by butylated hydroxyanisole and cysteine"
 Toxicol. Lett., 10, 177-182.

MOLINO G., CAVANNA A., BIONDI A.M., MACRI G., URIGU S., UGAZIO G. (1982)

"Bromsulphalein (BSP) kinetics in the rat: a new approach in evaluating experimental hepatotoxicity"

Int. Arch. Occup. Environ. Health, 51, 73-79.

MONTINI M., REBBA A., ONGARO A., PAGANI G., LEVONI P. (1976)

"Impiego controllato dell'acido 1,5-dicaffeilchinico nel trattamento delle sindromi iperdislipidemiche: osservazioni su 60 casi"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica, Turin. 181-188.

MORTIER F. (1972)

"De l'intérêt thérapeutique de certains acides organiques aliphatiques constituants de diverses drogues à réputation hépatorenale et en particulier de *Cynara scolymus* L."

Tesis Doctoral. Nancy.

MORTIER F., BOGAERT J.P., JOUANY J.M., DIXNEUF P., DELAVEAU P. (1976)

"Action d'un extrait purifié de *Cynara scolymus* L. (Composées) sur l'intoxication aiguë par l'éthanol"

Pl. méd. et phyt., 10 (1), 36-43.

MOSSER J., FROUILLOU M., VERGELY V., FAURAN F., CROS J. (1974)

"Pharmacologie des flavonoïdes: aspects pharmacocinétiques"

C.R. Ass. Gén. Groupe Polyphénols, Lyon.

NICHIFORESCU E. (1966)

"Variation of o-dihydroxyphenolic derivatives of the caffeic acid type in the artichoke (*Cynara scolymus*) during growth"

Ann. Pharm. Fr., 24 (6), 451-456.

NICHIFORESCU E., COUCOU V. (1966)

"Sur la répartition des o-dihydroxyphénols de type acide cafei que dans la feuille d'artichaut et sur leur variation en fonction de la température"

Ann. Pharm. Fr., 24 (2), 127-132.

NICHIFORESCU E., SIMIONOVICI M., BOESTEANU N., CRISTEA V., ANDRESCU M., CRISTESCU Y. (1976)

"Sur l'activité pharmacologique de l'acide 1,3-dicafeilquinique"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turin. 105-110.

NOE D.A., WEEDU V., BELL W.R. (1984)

"Direct spectrophotometry of serum hemoglobin: an Allen correction compared with a three-wavelength polychromatic analysis"

Clin. Chem., 30 (5), 627-630.

OHKAWA H., OHISHI N., YAGI K. (1979)

"Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction"

Anal. Biochem., 95, 351-358.

PANIZZI L., SCARPATI M.L. (1965)

"1,4- and 1,5- dicaffeylquinic acids"

Gazz. Chim. Ital., 95 (1-2), 71-82.

PARIS R., HERISET A. (1969)

"Culture et dessecation industrielle de feuilles d'artichaut (*Cynara scolymus* L.)"

Pl. méd. et phyt., 3 (1), 44-63.

PLAA G.L., HEWITT W.R., Du SONICH P., CAILLE G., LOCK S.
(1982)

"Isopropanol and acetone potentiation of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: single versus repetitive pretreatments in rats"

J. Toxicol. Environ. Health, 9, 235-250.

PLATT V.D., SCHNORR B. (1971)

"Biochemical and electronoptic studies on the possible influence of silymarin on hepatic damage induced by ethanol in rats"

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 21 (8), 1206-1208.

POHL L.R., MICO B.A. (1984)

"Electrophilic halogens as potentially toxic metabolites of halogenated compounds"

Trends Pharmacol. Sci., 5, 61-64.

POLONOVSKI J., ETIENNE J. (1969)

"Métabolisme hépatique des médicaments"

Thérapie, 24, 7-25.

POMERANZE J., CHESSIN M. (1955)

"Decholesterolizing agents"

Am. Heart J., 49, 262-266.

POULSEN H.E., RANEK L., ANDREASEN P.B. (1981)

"The hepatic glutathione content in liver diseases"

Scand. J. Clin. Invest., 41, 573-576.

PREZIOSI P. (1962)

"Dal Cynara scolymus all'acido 1,4-dicaffeilchinico"

Il Farmaco, Ed. Sc., 17 (9), 701-745.

PREZIOSI P., LOSCALZO B. (1956)

"L'azione sulla coleresi, sul colesterolo ematico e sulla lipoidosi colesterolica del principio attivo del carciofo e di sostanze ad essi correlate. Parte I e II.

Fitoterapia, 27, 666-690.

PREZIOSI P., LOSCALZO P. (1957)

"Valutazione sperimentale dell'acido 1,4-dicaffeilchinico vero principio del *Cynara scolymus*"

Arch. Ital. Sci. Farmacol., 3, 249.

PREZIOSI P., LOSCALZO B. (1958)

"Pharmacological properties of 1,4-dicaffeoylquinic acid, the active principle of *Cynara scolymus*"

Arch. Int. Pharmacodyn., 117 (1-2), 63-80.

PREZIOSI P., LOSCALZO B., MARMO E. (1959)

"Comparison of choleretic effects of CYN and Na-dehydrocholate" *Experientia*, 15 (4), 135-138.

PREZIOSI P., LOSCALZO B., MARMO E., MELE E. (1960)

"Effects of single or repeated treatment with several anticholesterolemic compounds on biliary excretion of cholesterol"

Biochem. Pharmacol., 5, 251-262.

PUSHPENDRAN C.K., SHENOY B.V., EAPEN J. (1977)

"Effect of carbon tetrachloride on glycogen metabolism in fasted & refed mice"

Ind. J. Exp. Biol., 15, 992-995.

RACZ-KOTILLA E., RACZ G., WISKY E. (1975)

"Effect of artichoke (*Cynara scolymus* L.) extracts on urination and salt voidance of rats"

Herba Hung., 14, 2-3.

PELLEGRIN P., LESNE M. (1983)

"La clairance hépatique des médicaments. Aspects physiologiques et pharmacocinétiques"

J. Pharmacol., 14 (2), 107-139.

PELT J.M. (1981)

"Le décortilage chimique d'une drogue complexe: l'artichaut"

En "La médecine par les plantes. Nouvelles propriétés thérapeutiques". Fayard. Paris. 220-224.

PENCIL S.D., GLENDE A.E., RECKNAGEL R.O. (1982)

"Loss of calcium sequestration capacity in endoplasmic reticulum of isolated hepatocytes treated with carbon tetrachloride"

Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., 36 (3), 413.

PEREZ R. (1983)

"Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl_4 an adequate model of human cirrhosis?"

Hepatology, 3 (1), 112-120.

PERRISSOUD D., AUDERSET G., REYMOND O., MAIGNAN M.F. (1981)

"The effect of carbon tetrachloride on isolated rat hepatocytes"

Virchows Arch. (Cell Pathol.), 35, 83-91.

PERRISSOUD D., MAIGNAN M.F., AUDERSET G. (1981)

"A morphological and biochemical study of the interaction of (+)-cyanidanol-3 with plasma membrane and protection against phalloidin and CCl_4 toxicity in isolated rat hepatocytes"

En "(+)-Cyanidanol-3 in diseases of the liver". Academic Press & Royal Society of Medicine. Londres. 284.

PERRISSOUD D., TESTA B. (1982)

"Hepatic Pharmacology: mechanism of action and classification of antinecrotic hepatoprotective agents"

Trends Pharmacol. Sci., 3 (9), 365-367.

PERRISSOUD D., WEIBEL I. (1980)

"Protective effect of (+)-cyanidanol-3 in acute liver injury induced by galactosamine or carbon tetrachloride in the rat"

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 312, 285-291.

PERRY M.C. (1982)

"Hepatotoxicity of chemotherapeutic agents"

Seminars in Oncology, 9 (1), 65-74.

PIAZZA M., GUADAGUINO V., PICCIOTTO L., MERCATO R., CHIRIANNI A., ORLANDO R., GOLDEN G. (1983)

"Effect of (+)-cyanidanol-3 in acute HAV, HBV, and NON-A, NON-B viral hepatitis"

Hepatology, 3 (1), 45-49.

PICCINELLI O. (1959)

"Esperienze cliniche sull'attività terapeutica dell'acido 1,4-dicaffeinilchinico associato ad epatoprotettori"

Gazz. Med. Ital., 118 (3), 477-481.

PIFFERI P.G., VACCARI A. (1978)

"Studi sui pigmenti naturali. X-gli-antociani del carciofo (Cynara scolymus L.)"

Industria-Conserve, 53 (2), 107-110.

PLAA G.L., HEWITT W.R. (1982)

"Toxicology of the liver"

Raven Press. Nueva York. 213-242.

RAMELLINI G., MELDOLESI J. (1976)

"Liver protection by silymarin: in vitro effect on dissociated rat hepatocytes"

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 26 (1), 69-73.

RAMIREZ J.I. (1981)

"Contribució a l'estudi del metabolisme lipídic a la fase perinatal, mitjançant la prolongació de la gestació en rata"

Tesina de Licenciatura. Fac. de Biología. Univ. de Barcelona. 112.

RASHEVSKAYA A.M., EVLASHKO Y.P. (1974)

"Current state of the problem of porphyrin metabolism in clinical studies of occupational diseases"

Fiziol. Patol. Obmema Porfirinov Gema Mater. Simp. Muzyka V. I., Kakhin K.A., Evlashko Y.P. 9-12.

RAUEN H.M., SCHRIEWER H. (1971)

"The antihepatotoxic effect of silymarin on liver damage in rats induced by carbon tetrachloride, D-galactosamine and allyl alcohol"

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 21 (8), 1194-1201.

RAUEN H.M., SCHRIEWER H. (1973)

"Multivariate analyse experimenteller leberschädigungen"

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 23 (1), 106-107.

RAUEN H.M., SCHRIEWER H., FELS H. (1973)

"Die antihepatotoxische Wirkung aliphatischer und heterozyklischer mercaptoverbindungen bei der Leberschädigung der Ratte durch CCl_4 . I"

RAUEN H.M., SCHRIEWER H., FELS H. (1973)

"Die antihepatotoxische Wirkung aliphatischer und heterozyklischer mercaptoverbindungen bei der Leberschädigung der Ratte durch CCl_4 . II"

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 23 (1), 136-140/141-145.

- RAUEN H.M., SCHRIEWER H., GEBAUER B., ABU TAIR M. (1973)
 "Die wirkung essentieller phospholipide bei der akuten
 experimentellen leberschädigung durch CCl_4 "
 Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 23 (9), 1332-1334.
- RAUEN H.M., SCHRIEWER H., KOPP O., PETERS U. (1973)
 "Biochemische umweltprobleme I: Die leberschädigende wirkung
 von tensiden: Dodecylsulfat"
 Arzneim.-Forsch. (Drug Res.), 23 (1), 134-135.
- RAUEN H.M., SCHRIEWER H., TEGTBAUER U., LASANA J.E. (1973)
 "Silymarin verhindert die lipidperoxidation bei der CCl_4 -
 leberschädigung"
 Experientia, 29 (11), 1372.
- RECKNAGEL R.O. (1967)
 "Carbon tetrachloride hepatotoxicity"
 Pharmacol. Rev., 19 (2), 145-208.
- RECKNAGEL R.O. (1983)
 "Carbon tetrachloride hepatotoxicity: status quo and future
 prospects"
 Trends Pharmacol. Sci., 4 (3), 129-131.
- REED MUENCH, PIZZI (1950)
 "Sampling variation of the sixty per cent end-point,
 determined by the Reed-Muench (Behrens) method"
 Human Biol., 22 (3), 151-190.
- REED D.J., FARISS M.W. (1984)
 "Glutathione depletion and susceptibility"
 Pharmacol. Rev., 36 (2), 255-335.

REUTTER W., BAUER C., BACHMANN W., LESCH R. (1975)

"The galactosamine refractory regenerating rat liver"

En "Liver regeneration after experimental injury". Lesch R., Reutter W. Stratton Intercontinental Medical Book Corp. 259-272.

RIDDLES P.W., BLAKELEY R.L., ZERNER B. (1979)

"Ellmans's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid.- A reexamination"

Anal. Biochem., 94, 75-81.

RIMINGTON C. (1960)

"Spectral-absortion coefficients of some porphyrins in the Soret-band region"

Biochem. J., 75, 620-623.

RIMINGTON C. (1971)

"Quantitative determination of porphobilinogen and porphyrins in faeces and erythrocytes"

Broadsheet 70, 8, 1-9.

ROBERTI R., BINAGLIA L., GIOVAGNOLI E., FRANCESCANGELI E., CALIGIANA P. (1976)

"Influenza della cinarina e dell'acido caffeico sul metabolismo fosfolipidico durante fegato grasso da etanolo"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turín. 153-156.

ROBERTS E., AHLUWALIA M.B., LEE G., CHAN CH., SARMA D.S.R., FARBER E. (1983)

"Resistance to hepatotoxins acquired by hepatocytes during liver regeneration"

Cancer Res., 43, 28-34.

ROHRBACH P., ROBINEAU M. (1958)

"Etude pharmacologique de choléretiques de synthèse I.- Modifications du débit biliaire"

Arch. Int. Pharmacodyn., 116, 136.

ROJKIND M., URIBE M., KERSHENOBICH D. (1973)

"Colxicine and the treatment of liver cirrhosis"

The Lancet, 6, 38-39.

ROJKIND M., DIAZ de LEON L. (1970)

"Collagen biosynthesis in cirrhotic rat liver slices. A regulatory mechanism"

Biochim. Biophys. Acta, 217, 512-522.

ROZE C.L., SOUCHARD M., CUCHET P., VAILLE C. (1980)

"Action de deux hypolipémiants sur le foie du rat atteint d'une hépatite à la galactosamine"

J. Pharmacol., 11 (1), 57-69.

RUITER N., OTTENWALDER H., MULIAWAN H., KAPPUS H. (1982)

"Lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes measured by ethane and n-pentane formation"

Arch. Toxicol., 49, 265-273.

RUPPIN D.C., FRYDMAN M.I., LINEZER M.R. (1982)

"Value of serum gamma-glutamyltransferase activity in the diagnosis of hepatobiliary disease"

Med. J. Aust., 1, 421-424.

RUSHMORE T.H., LIM Y.P., GHOSHAL A.K. (1984)

"Rapid lipid peroxidation in the nuclear fraction of rat liver induced by a diet deficient in choline and methionine"

Cancer Lett., 24, 251-255.

SALVE M.L. (1983)

"Tests bioquímicos de función hepática"

Asociación Española de Farmacéuticos Analistas F.C., 7.

SAMOCHOWICC L. (1959)

"Experimental atherosclerosis XV. The effect of Cynara scolymus and Cynara cardunculus on the development of experimental atherosclerosis in white rats"

Dissertation Pharm., 11. 99-113.

SANTONE K.S., ACOSTA D., BRUCKNER J.V. (1982)

"Cadmium toxicity in primary cultures of rat hepatocytes"

J. Toxicol. Environ. Health, 10, 169-177.

SARDESAI V.M., MANNING J.A. (1968)

"The determination of triglycerides in plasma and tissues"

Clin. Chem., 14 (2), 156-161.

SCARPATI M.L., ESPOSITO P. (1963)

"Neochlorogenic acid and "Band 510" structure"

Tetrahedron Lett., 18, 1147.

SCARPATI M.L., GUIZO M. (1963)

"Acidi caffeil-chinici del caffè e del maté"

Ann. Chim., 53, 1315.

SCARPATI M.L., GUIZO M. (1964)

"Structure of the three dicaffeoylquinic acids of coffee (Isochlorogenic acid)"

Tetrahedron Lett., 39, 2851-2853.

SCARPATI M.L., ORIENTE G., PANIZZII L. (1957)

"The caffeic constituents of artichokes"

Ann. Chim., 47, 150-154.

SCARPATI M.L., ORIENTE G., PANIZZI L. (1958)

"Synthesis of new caffeylquinic compounds"

Ann. Chim., 48, 997-1006.

SCARPATI M.L., TROGOLO C., PANIZZI L. (1964)

"Synthesis of some caffeylquinic acids"

Ann. Chim., 54 (1-2), 56-65.

SCHAPIRA G. (1981)

"Biochimie hépatique"

En "Biochimie clinique et physiologique". Flammarion Médecine Sciences. Paris. 313-321.

SCHALAEGER R., HAUX P., KATTERMANN R. (1982)

"Studies on the mechanism of the increase in serum alkaline phosphatase activity in cholestasis: significance of the hepatic bile acid concentration for the leakage of alkaline phosphatase from rat liver"

Enzyme, 28, 3-13.

SCHNEIDER G., THIELE K. (1974)

"The distribution of the bitter principle cynaropicrin in *Cynara* spp."

Pl. Med., 26 (2), 174-183.

SCHONOLZER G. (1939)

"Weber die Beeinflussung des Cholesterinstoffwechsels durch das aktive Prinzip der Artischocke und seine Anwendung in der therapie des Arteriosklerose"

Schweiz. Med. Woschr., 69, 1288.

SCHWERTZ D.W., LAMB R.G. (1982)

"The influence of carbon tetrachloride metabolism on the carbon tetrachloride-induced activation of rat liver cell phospholipase C activity"

Toxicol. Appl. Pharmacol., 65, 402-412.

SEDLACK J., LINDSAY R.H. (1968)

"Estimation of total protein-bound and nonprotein bound sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent"

Anal. Biochem., 25, 192.

SEGLIN P.O. (1976)

"Preparation of isolated rat liver cells"

En "Methods in Cell Biology", vol. XIII. Prescott D.M. Academic Press. Nueva York.

SEZE S. (1934)

"La feuille d'artichaut on thérapeutique"

Prog. Méd., 2, 1919.

SHIMOYAMA T., MIKAWA K., KIKUCHI H., ISHIWATARI J. (1965)

"Clinical experience with 2-mercaptopropionylglycine.- Especially in drug-poisoned liver disorders"

Jap. J. Gastroenterol., 62, 717.

SIDRANSKY H., VERNEY E. (1982)

"Acute effects of selected hepatotoxic agents on polyribosomes and protein synthesis in the livers of rats fed purified diets containing hepatocarcinogens"

Exp. Mol. Pathol., 36, 72-85.

SIES H., AKERBOOM T.P.M., CADENAS E. (1982)

"The role of glutathione in hepatic hydroperoxide metabolism"

Biochem. Soc. Trans., 10, 79-80.

SMITH M.D., GIBSON G.E., ROWLAND R. (1982)

"Combined hepatotoxicity and neurotoxicity following sulphasalazine administration"

Aust. N. Z. J. Med., 12, 76-80.

SMUCKLER E.A., JAMES J.L. (1984)

"Irreversible cell injury"

Pharmacol. Rev., 36 (2), 77S-91S.

SOKOLOVA V.E., LYNBARTSEVA C.A., VASIL'CHENKO E.A. (1970)

"Effect of the artichoke (*Cynara scolymus*) on some aspects of nitrogen metabolism in animals"

Farmakol. Toksikol., 33 (3), 340-343.

SOMENBICHLER J., MATTERSBERGER J. ROSEN H. (1976)

"Stimulation of RNA synthesis in rat liver and isolated hepatocytes by sylibin, an antihepatotoxic agent from *Silybum marianum* L. Gaertn"

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 357 (8), 1171-1180.

SONDHEIMER E., SZYMANSKI C.D., CORSE J.W. (1961)

"Isolation of chlorogenic acid and its isomers from coffee"

J. Agric. Food Chem., 9 (2), 146-149.)

STACEY N.H., OTTENWALDER H., KAPPUS H. (1982)

"CCl₄-induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes with different oxygen concentrations"

Toxicol. Appl. Pharmacol., 62, 421-427.

STACEY N.H., KAPPUS H. (1982)

"Comparison of methods of assessment of metal-induced lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes"

J. Toxicol. Environ. Health, 9, 277-285.

STEGE T.E. (1982)

"Acetaldehyde-induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes"

Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., 36 (2), 287.

STOHS S.J., AL-ZURK W.A., AUGLE C.R. (1982)

"Glutathione S-transferases and glutathione reductase activities in hepatic and extrahepatic tissues of female mice as a function of age"

Biochem. Pharmacol., 3 (11), 2113-2116.

STRUBELT O., OBERMEIER F., SIEGERS C.P. (1978)

"The influence of ethanol pretreatment on the effects of nine hepatotoxic agents"

Acta Pharmacol. Toxicol., 43, 211-218.

STRUBELT O. (1980)

"Interactions between ethanol and other hepatotoxic agents"

Biochem. Pharmacol., 29, 1445-1449.

TALLARIDA R.J., MURRAAY R.B. (1981)

"Manual of pharmacologic calculation with computer programs"

Springer-Verlag. Nueva York.

THURMAN R.G., KAUFFMAN F.C. (1980)

"Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes"

Pharmacol. Rev., 31 (4), 229-246.

TIMMERMAN B.N., HOFFMANN J.J., JOLAD S.D., SCHRAM K.H., KLENCH R.E., BATES R.B. (1983)

"Constituents of *Chrysothamnus paniculatus* 3: 3,4,5-tricaffeoylquinic acid (a new shikimate prearomatic) and 3,4-, 3,5- and 4,5-dicaffeoylquinic acids"

J. Nat. Prod., 46 (3), 365-368.

TIXIER L. (1939)

"Les actions physiologiques et thérapeutiques du *Cynara scolymus*" "

Pres. Méd., 47, 880.

TSAO S.CH., IGA T., SUGIYAMA Y., HANANO M. (1982)
"Effect of chlorpromazine on isolated hepatocytes"
Biochem. Pharmacol., 31 (4), 491-497.

TUCHWEBER B., TROST W., SALAS M., SIECK R. (1976)
"Prevention of praseodymium-induced hepatotoxicity by silybin"
Toxicol. Appl. Pharmacol., 38 (3), 559-570.

TUTIN T., HEYWOOD D., VALENTINE D., BURGESS N., WALTERS S.,
WEEB D. (1976)
"Flora Europaeae. Vol. 4, Plantaginaceae to Compositae (and
Rubiaceae)"
Cambridge University Press.

TUTOR J.C., PAZ J.M., LOPEZ A. (1983)
"Determinación espectrofotométrica directa de las porfirinas
totales en orina"
Quím. Clin., 2 (1), 5-10.

TYNTYULKOVA N.S., TUNEVA S., GORANTCHEVA U., TANEV G., ZHIVKOV
V., CHELIBONOVA-LORER H., BOZHKOVA S. (1981)
"Hepatoprotective effect of silymarin (carsil) on liver of
D-galactosamine-treated rats: biochemical and morphological
investigations"
Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 3 (2), 71-77.

URITANI I., MIYANO M. (1955)
"Derivatives of caffeic acid in sweet potato attacked by black
rot"
Nature (Lond.), 175, 312.

VAN de WERVE G. (1980)
"Isolation and characteristics of hepatocytes"
Toxicology, 18, 179-185.

VAN der HOEVEN T.A., COON M.J. (1974)

"Preparation and properties of partially purified cytochrome P-450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome reductase from rabbit liver microsomes"

J. Biol. Chem., 249 (19), 6302-6310.

VOGEL G., TROST W., HALBACH G. (1974)

"Etude de l'action protectrice de la silymarine vis-à-vis de l'intoxication par la phalloïdine chez la souris"

Agressologie, 15 (4), 263-270.

VOGEL G. (1977)

"Natural substances with effects on the liver"

Springer-Verlag. Berlin.

VORBERG G. (1980)

"Cynarix: therapeutische erfahrungen bei fettstoffwechselstörungen mit cynarix in der allgemeinpraxis"

Teitsch. Allgemeinmedizin, 56 (25), 1598-1602.

VRIES J. (1983)

"Induction and prevention of biochemical disturbances in hepatic necrosis"

Trends Pharmacol. Sci., 4, 393-394.

WAGNER H. (1974)

"The chemistry and pharmacology of the flavonolignans of *Silybum marianum*"

C.R. Ass. Gén. Groupe Polyphénols, Lyon.

WALLER R.L., GLENDE E.A. RECKNAGEL R.O. (1983)

"Carbon tetrachloride and bromotrichloromethane toxicity. Dual role of covalent binding of metabolic cleavage products and lipid peroxidation in depression of microsomal calcium sequestration"

Biochem. Pharmacol., 32 (10), 1613-1617.

WEDDLE CH.C., HORNBROOK K.R., McCAY P.B. (1976)

"Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride"

J. Biol. Chem., 251 (16), 4973-4978.

WEIB R.F. (1973)

"Medikamentöse therapie der lebererkrankungen"

Phys. Med. Reh. Helf, 8, 229-232.

WILSON D.P., WATSON R., KNOOK D.L. (1982)

"Effects of age on rat liver enzymes. A study using isolated hepatocytes, endothelial and kupffer cells"

Gerontology, 28, 32-48.

WOJCICKI J., WOYKE M. (1974)

"Clinical evaluation of the preparation cynarhein"

Herba Pol., 20 (4), 379-385.

WOJCICKI J., BOBNIS W., OLSZEWSKA M., SZMATLOCK E. (1976)

"Experimental and clinical investigations on hypolipidemic action of 1,5-dicaffeoylquinic acid"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turín. 175-180.

WOJEWSKI A., SAMOCHOWIEC L., ZAJACZKOWSKI T., SZYSZKA K., ZAJACZKOWSKA E., ABUCEWICZ A. (1976)

"The influence of cynarine on the aortic wall antiparacoagulating activity, soluble fibrin monomer complexes and plasma fibrinolytic activity in white rats chronically intoxicated by carbon disulphide"

En "Nuovi Studi sul Carciofo". Minerva Medica. Turín. 139-143.

YOSHIKAWA T., FURUKAWA Y., WAKAMATSU Y., KONDO M. (1982)

"Immunopotentiators and the protection they give against carbon tetrachloride hepatotoxicity"

Experientia, 38, 501-502.

YOUNES M., SIEGERS C-P. (1981)

"Inhibitory action of some flavonoids on enhanced spontaneous lipid peroxidation following glutathione depletion"

Pl. Med., 43, 240-244.

ZIEGLER K., FRIMMER M., MOLLER W., FASOLD H. (1982)

"Affinity labels for membrane components involved in the uptake of bile acids and of phallotoxins by hepatocytes. Development of covalently binding derivatives of bile acids and of compounds related to cholecystographic agents"

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 319, 249-253.

ZIMMERMAN H.J. (1978)

"Direct (toxipathic) hepatotoxins: haloalkanes and elemental phosphorus"

En "Hepatotoxicity. The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver". Appleton-Century-Grofts. Nueva York. 198-210.